

Untersuchungen zur Differenzierung
von *Stachybotrys chartarum*-Chemotypen
mittels
Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie

von Julia Christin Ekruth

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Untersuchungen zur Differenzierung von *Stachybotrys chartarum*-Chemotypen
mittels
Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie

von Julia Christin Ekruth
aus Stade
München 2021

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit

Arbeit unter der Anleitung angefertigt von: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis

Mitbetreuung durch: Dr. rer. nat. Christoph Gottschalk
Prof. Dr. Karin Schwaiger

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatte: Univ.-Prof. Dr. Manfred Gareis

Korreferent: Prof. Dr. Frank Ebel

Univ.-Prof. Dr. Benedikt Sabaß

Tag der Promotion: 06. Februar 2021

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literatur	3
2.1	Gattung <i>Stachybotrys</i>	3
2.1.1	Taxonomie.....	3
2.1.2	Wachstumsbedingungen.....	5
2.1.3	Sekundärmetabolismus.....	6
2.1.3.1	Trichothecene.....	7
2.1.3.2	Atranone.....	11
2.1.3.3	Phenylspirodrimane	13
2.1.4	Vorkommen und medizinische Bedeutung.....	14
2.1.4.1	Futtermittel	14
2.1.4.2	Lebensmittel	18
2.1.4.3	Wohn- und Arbeitsräume.....	19
2.2	Methoden zur Differenzierung	22
2.2.1	Kultur- und Mikromorphologie	22
2.2.2	Molekularbiologie	24
2.2.3	Infrarotspektroskopie.....	25
2.2.3.1	Prinzip.....	25
2.2.3.2	FT-IR-Spektroskopie.....	26
3	Publikation	33
4	Diskussion	55
5	Zusammenfassung	61
6	Summary	63
7	Literaturverzeichnis	65
8	Danksagung	79

Abkürzungsverzeichnis

a_w	Wasseraktivität
ATR	attenuated total reflection
ATR	Atranon-Gencluster
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
chs1	Chitinsynthase
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
ITS	internal transcribed spacer
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
MALDI-TOF	Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung mit Flugzeitanalyse
MEA	Malzextrakt-Agar
MEB	Malzextrakt-Bouillon
MTT-Test	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (=MTT)-Test
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDA	Potato-Dextrose-Agar
PDB	Potato-Dextrose-Bouillon
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
<i>S.</i>	<i>Stachybotrys</i>
SAT	Satratoxin-Gencluster
SBS	Sick Building Syndrome
SC1, 2, 3	Abschnitte 1, 2 und 3 vom Satratoxin-Gencluster
SK-Zellen	Swine-Kidney Zellen
sp.	Spezies (Einzahl)
spp.	Spezies plurales (Mehrzahl)
tub 1	beta-tubulin 1
tri5	Trichodiensynthase 5

1 Einleitung

Schimmelpilze der Gattung *Stachybotrys* (S.) kommen ubiquitär auf welkenden und feuchten zellulosehaltigen Materialien vor, da sie zellulolytisch aktiv sind (Nielsen et al., 1998).

Sie produzieren verschiedene Mykotoxine, woraus sich für Menschen und Tiere Gesundheitsrisiken ergeben. Bei Pferden kann durch die Aufnahme von verschimmeltem Stroh die tödlich verlaufende Stachybotryotoxikose ausgelöst werden (Forgacs, 1972). Für Menschen besteht ein Gefährdungspotential im Kontakt mit toxischen Stämmen in Futtermitteln oder in kontaminierten Innenräumen nach Wasserschäden über die inhalative Exposition oder den direkten Kontakt (Hintikka, 1978; Johanning, 1994).

Bei der Spezies *S. chartarum* werden die Chemotypen A und S unterschieden. Stämme des Chemotyps A bilden einfache Trichothecene und Atranone. Die durch hochgradige Zytotoxizität ausgezeichneten makrozyklischen Trichothecene sind für *S. chartarum* Chemotyp S und *S. dichroa* beschrieben (Andersen et al., 2003; Jarvis et al., 1995). Anhand der Detektion von Satratoxin- und Atranon-Genclustern wurde neuerdings außerdem die Unterteilung in drei Genotypen vorgeschlagen (Ulrich et al., 2019).

Neben molekularbiologischen und massenspektrometrischen Methoden zur Differenzierung von Mikromyzeten nehmen infrarotspektroskopische Ansätze an Bedeutung zu. Bei der Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR) wird die Probe mit Infrarotstrahlung durchleuchtet und die dabei entstehenden Interferogramme werden per Fourier-Transformation in Spektren umgewandelt (Burgula et al., 2007; Günzler und Gremlich, 2012). Die Spektren können direkt verglichen oder nach statistischer Auswertung in Form von Dendrogrammen zur Identifizierung von Bakterien und Hefen verwendet werden (Dinkelacker et al., 2018; N.N., 2017; Naumann, 1985; Naumann et al., 1988; Taha et al., 2013). Die Anwendung auf Schimmelpilze wie *Aspergillus* spp. oder *Penicillium* spp. wurde bereits beschrieben. *Stachybotrys* spp. wurden bisher jedoch in keiner dieser Studien berücksichtigt (Fischer et al., 2006; Gordon et al., 1998; Lecellier et al., 2014; Shapaval et al., 2013).

Das Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob und inwieweit die Chemotypen A und

S von *S. chartarum* mit der FT-IR Spektroskopie unterscheidbar sind und diese Technik als ergänzenswerte Methode zur Charakterisierung von *S. chartarum*-Isolaten zu überprüfen.

2 Literatur

2.1 Gattung *Stachybotrys*

2.1.1 Taxonomie

Im Jahr 1837 isolierte der österreichische Botaniker Corda einen schwarzen Schimmelpilz von einer Tapete in Prag, beschrieb diesen morphologisch und benannte ihn als Erster *Stachybotrys* (*S.*) *atra* (Corda, 1837).

Zunächst wurden bis 1943 insgesamt 20 Spezies der Gattung *Stachybotrys* zugeordnet, die dann anhand der Farbe der Kolonien auf die zwei Spezies *S. atra* und *S. subsimplex* reduziert wurden (Bisby, 1943). Hughes (1958) hielt nach seinen Untersuchungen von Form und Beschaffenheit der Konidiophoren und Konidien die Spezies *S. atra* und *Stilbospora chartarum* für artverwandt und schlug daher eine einheitliche Benennung beider Spezies in *Stachybotrys chartarum* vor, was durch Jong und Davis (1976) umgesetzt wurde.

Die Taxonomie von *Stachybotrys* ist uneinheitlich, da Gattungen lediglich anhand ihrer Morphologie bestimmt wurden. So wurden Schimmelpilze der Gattung *Memnoniella* anhand der Morphologie und Sporenbildung zunächst als eigenständige Gattung angesehen (Jong und Davis, 1976). Erst nach den DNA-Analysen von Haugland et al. (2001) wurde diese Gattung *Stachybotrys* zugeordnet. Die Zusammengehörigkeit von *Memnoniella* und *Stachybotrys* konnte auch anhand des Metabolitenprofils bestätigt werden (Wang et al., 2014).

In den letzten Veröffentlichungen zur Taxonomie der Stachybotriaceae werden 75 Spezies zu dieser Gattung gezählt (Lombard et al., 2016; Wang et al., 2015).

Darunter sind die wichtigsten Toxinbildner *S. chartarum* Chemotyp S und *S. dichroa* für die makrozyklischen Trichothecene und *S. chartarum* Chemotyp A, *S. chlorohalonata* sowie *S. microspora* für die Atranone (Andersen et al., 2002; Andersen et al., 2003).

Isolate von *S. chartarum*, die aus Gebäuden mit Wasserschäden isoliert wurden, ähnelten sich zwar in ihrer Morphologie, wiesen aber Unterschiede in den Metabolitenprofilen und den proinflammatorischen sowie immunmodulatorischen Effekten auf. Dies führte zu uneindeutigen taxonomischen Einordnungen (Andersen et

al., 2003; Fung et al., 1998; Jarvis et al., 1998; Vesper et al., 2000b; Vesper et al., 1999). Die genauere Differenzierung im Hinblick auf Morphologie, Phylogenetik und Metabolitenproduktion von 25 zunächst als *S. chartarum* identifizierten Isolaten ergab, dass sich die Isolate in drei Gruppen unterteilen lassen. Es wurde festgestellt, dass bei *S. chartarum* aufgrund des Mykotoxinprofils zwei Chemotypen unterscheidbar sind. Der Chemotyp A produziert Atranone und Dolobellane, der Chemotyp S kann die hochgradig zytotoxischen makrozyklischen Trichothecene bilden. Außerdem konnte eine bis dahin unbekannte Spezies abgegrenzt werden, die *S. chlorohalonata* genannt wurde (Andersen et al., 2003). Diese Untergliederung in zwei eigenständige, eng verwandte Spezies wurde von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt (Lombard et al., 2016).

In Genomanalysen zeigte sich, dass sich *S. chartarum*-Stämme anhand ihrer Gencluster für die Toxinbildung in drei unterschiedliche Genotypen unterteilen lassen. Der Genotyp A verfügt über den ATR-Gencluster für die Atranonproduktion, der Genotyp S über den SAT-Gencluster für die Satratoxinproduktion. Bei dieser Einteilung wird ein weiterer Genotyp H eingeführt, der über den Gencluster für die Atranonproduktion und einen unvollständigen Gencluster für die Satratoxine verfügt und daher als Hybridtyp angesehen wird (Ulrich et al., 2019).

2.1.2 Wachstumsbedingungen

Stachybotrys spp. wachsen bevorzugt auf zellulosehaltigen Materialien, da sie in der Lage sind, Kohlenstoff aus Zellulose zu beziehen (McQuade, 1963; Samson, 2010).

Der Tabelle 1 sind Angaben zu den geeigneten Wachstumsbedingungen von *Stachybotrys* spp. mit Zuordnung der jeweiligen Publikation zu entnehmen.

Tabelle 1: Übersicht zu Wachstumsbedingungen von *Stachybotrys* spp.

Wachstumsparameter	Referenz
Glucose als limitierender Wachstumsfaktor für <i>Stachybotrys</i> spp. und <i>Memnoniella echinata</i>	Buston und Basu (1948) McQuade (1963)
Optimum für <i>S. atra</i> ¹ : 23 °C, 0,98 a _w 7 °C – 37 °C, min. 0,94 a _w	Ayerst (1969)
Biotin als limitierender Wachstumsfaktor für <i>Memnoniella echinata</i>	Buston und Basu (1948) Steinberg (1939)
geeignete Bebrütungstemperatur 25 °C und Nährmedien PDA, MEA für <i>Stachybotrys</i> spp.	Samson (2010)
<i>S. chartarum</i> auf PDA Optimum für Wachstum: 25 °C, 0,997 a _w Optimum für Sporulation: 25 °C – 30 °C, 0,95 – 0,98 a _w ; für Chemotyp S 20 °C – 30 °C, für Chemotyp A 25 °C – 30 °C	Frazer et al. (2011)

¹Synonym von *S. chartarum*

Grundsätzlich sind für das Wachstum von *Stachybotrys* hohe a_w-Werte (min. 0,94) notwendig und die optimale Bebrütungstemperatur wird meist mit 25 °C angegeben. Eine Restriktion von Wachstum und Sporulation einiger Spezies von *Stachybotrys* wurde in verschiedenen Studien durch Variation der Biotin- und Glukosegehalte in den Nährmedien gezeigt (Buston und Basu, 1948; McQuade, 1963; Steinberg, 1939).

2.1.3 Sekundärmetabolismus

Im Gegensatz zu den Metaboliten des Primärstoffwechsels scheinen die Metaboliten des sekundären Stoffwechsels nicht zur Lebenserhaltung eines Organismus beizutragen. Sie wurden daher in der Literatur fälschlicherweise auch als „Abfall- oder Detoxifikationsprodukte“ (Haslam, 1986) bezeichnet. Die Metabolite des sekundären Stoffwechsels zeichnen sich durch ein geringes Molekulargewicht aus, das 3000 Da nur im Einzelfall überschreitet (Keller et al., 2005; Williams et al., 1989).

Metabolite können auch als Intro- bzw. Extrolite bezeichnet werden. Introlite sind dabei den Primärmetaboliten gleichzusetzen. Bei dieser Unterscheidung werden Extrolite als chemische Substanzen bezeichnet, die vom bildenden Organismus nach außen abgegeben werden. Sie können sowohl an die Umwelt abgesondert als auch in der Zellwand angesammelt werden. Folglich dienen Extrolite der Interaktion mit der abiotischen und biotischen Umwelt (Samson und Frisvad, 2004). Diese Definition für Mykotoxine ist letztlich genauer und der Bezeichnung „Sekundärmetabolite“ vorzuziehen.

Mykotoxine weisen als Extrolite ökologische Funktionen auf, sie wirken beispielsweise antibiotisch, antifungisch, insektizid und phytotoxisch (Fleming, 1929; Vesper und Vesper, 2002; Xu et al., 1992). Sie werden zur Vorteilsbeschaffung im Kampf um Nährstoffe gegen Konkurrenten eingesetzt (Gareis und Gottschalk, 2014; Jarvis et al., 1995).

Die Metabolite von *Stachybotrys* spp. lassen sich in drei übergeordnete Gruppen einteilen (s. Abbildung 1). *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* produzieren gemeinsam alle drei Gruppen: Atranone, Satratoxine und Phenylspirodrimane (Andersen et al., 2003).

Die Spezies *S. chartarum* kann in die Chemotypen A und S sowie den Hybridgenotyp H untergliedert werden, die sich anhand phylogenetischer Kriterien und des Metabolitenprofils (s. Tabelle 2) unterscheiden.

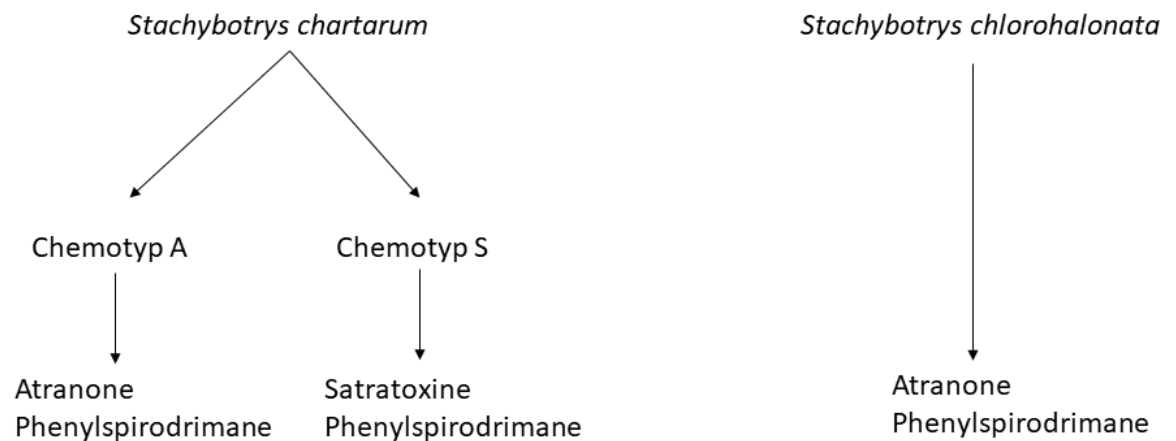


Abbildung 1: Metabolitenproduktion von *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* nach Andersen et al. (2003) und Jagels et al. (2019)

Tabelle 2: Übersicht über die Bildung von Sekundärmetaboliten von *S. chartarum* (nach Andersen et al. (2003))

<i>S. chartarum</i>	Atranone	einfache Trichothecene	makrozyklische Trichothecene	Phenylspirodrimane
Chemotyp A	+	+	-	+
Chemotyp S	-	+	+	+
Genotyp H*	n.b.	n.b.	-	n.b.

+ ≙ Bildung nachgewiesen; - ≙ Bildung nicht nachgewiesen; n.b. ≙ nicht bekannt; * nach Ulrich et al. (2019)

2.1.3.1 Trichothecene

Zu der Stoffgruppe der Trichothecene werden über 150 Substanzen gezählt, die zu den zyklischen Sesquiterpenen gehören. Das Grundgerüst bilden ein trizyklisches Trichothecan und eine Epoxygruppe zwischen den Kohlenstoffatomen C-12 und C-13. Zudem ist zwischen den Kohlenstoffatomen C-9 und C-10 häufig eine Doppelbindung zu finden. Das Grundgerüst ist mit einer variablen Anzahl von Hydroxygruppen verestert (Ueno, 1983).

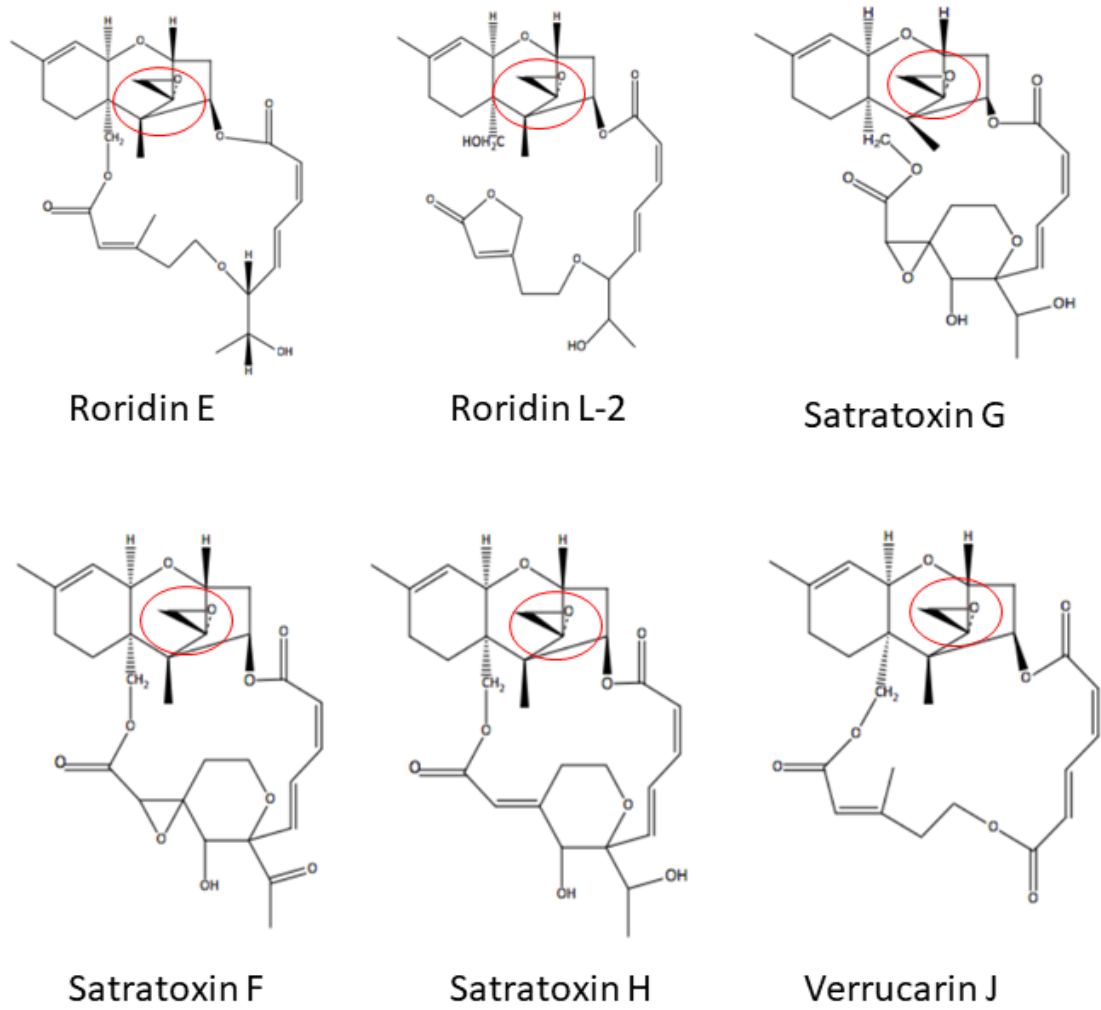


Abbildung 2: Strukturformeln einiger makrozyklischer Trichothecene, die von *S. chartarum* gebildet werden; ohne Isoformen nach Cole et al. (2003); Rot: Epoxygruppe

Sie werden anhand des strukturellen Aufbaus in die Typen A-D eingeteilt. Der Differenzierung der Trichothecen-Typen ist die Unterscheidung von einfachen und makrozyklischen Trichothecenen übergeordnet (Ueno, 1983).

Die Trichothecene der Typen A und B zählen zu den einfachen Trichothecenen und unterscheiden sich anhand einer Ketogruppe am Kohlenstoffatom C-8, die nur bei Typ B zu finden ist.

Typ C-Trichothecene weisen eine oder mehrere zusätzliche Epoxygruppen auf und können in der einfachen oder in der makrozyklischen Form vorliegen. Die makrozyklische Form besteht aus einem Ringsystem zwischen den Kohlenstoffatomen C-4 und C-15 (Cole et al., 2003). Zu den makrozyklischen Trichothecenen zählen außerdem die Trichothecene des Typs D. Sie sind durch eine Epoxygruppe zwischen den Kohlenstoffatomen C-12 und C-13 gekennzeichnet (s. Abbildung 2). Der Aufbau des makrozyklischen Ringsystems ist variabel, wohingegen das trizyklische Grundgerüst unverändert bei jeder Substanz dieses Typs vorliegt (Ueno, 1983).

In Bezug auf die Toxizität ist bei den makrozyklischen Trichothecenen die Epoxygruppe zwischen den Kohlenstoffatomen C-12 und C-13 entscheidend, da sie irreversibel an die 60S-Untereinheit von Ribosomen bindet und durch Interaktion mit der Peptidyltransferase die Proteinbiosynthese inhibiert (Feinberg und McLaughlin, 1989; Hernandez und Cannon, 1982; Rocha et al., 2005; Ueno, 1977).

Im diagnostischen Zellkulturtest zum Nachweis von Zytotoxizität zeigten die makrozyklischen Trichothecene Satratoxin G, Roridin A sowie Verrucarin A eine ca. 20-fach höhere inhibitorische Konzentration (IC_{50} ; 0,001-0,007 $\mu\text{g/mL}$) gegenüber porcinen Nierenzellen (SK-Zellen) als das T2-Toxin (0,018 $\mu\text{g/mL}$) des Typs A (Gareis, 2006; Hanelt et al., 1994).

Durch makrozyklische Trichothecene können außerdem Ödeme und Hautschädigungen verursacht werden, da sie membran- und kapillargefäßschädigend wirken. Sie haben zudem einen immunsuppressiven Effekt (Ueno, 1984).

S. chartarum und *S. chlorohalonata* bilden Trichodermol und Trichodermin, die zum Typ A gezählt werden (Andersen et al., 2002; Andersen et al., 2003; Nielsen et al., 1998).

Der Chemotyp S von *S. chartarum* bildet die makrozyklischen Trichothecene Satratoxin F, G, H, Roridin E und L-2 sowie Verrucarin J (Andersen et al., 2002; Jarvis, 2003).

Die Tabelle 3 ordnet den Trichothecen-Typ den Gattungen zu, durch die sie gebildet werden.

Tabelle 3: Zuordnung der Trichothecen-Typen A-D zu den produzierenden Gattungen bzw. Spezies

	Typ A	Typ B	Typ C	Typ D
Produzierende Gattung bzw. Spezies	<i>Fusarium</i> spp. ¹		<i>Cephalosporium</i> spp. ³	<i>S. chartarum</i> Chemotyp S ⁴
	<i>S. chartarum</i> ² <i>S. chlorohalonata</i> ²		<i>Trichothecium</i> spp. ³	<i>Myrothecium</i> spp. ⁴

¹ nach Ueno (1983); ² nach Andersen et al. (2002) und Nielsen et al. (1998); ³ nach Cole et al. (2003); ⁴ nach Andersen et al. (2003) und Jarvis (2003)

2.1.3.2 Atranone

Die chemische Grundstruktur von Atranonen setzt sich aus einem Dolabellan-Diterpen-Ring sowie einem Enol-Lacton-System (s. Abbildung 3) zusammen.

Atranone werden von *S. chartarum* Chemotyp A und *S. chlorohalonata* gebildet, die beide keine makrozyklischen Trichothecene bilden (Andersen et al., 2003; Hinkley et al., 1999; Nielsen et al., 2002).

Für den neu beschriebenen Genotyp H von *S. chartarum* ist in einer Triplex-PCR der Gencluster ATR für die Atranonbildung nachweisbar. Das Metabolitenprofil ist jedoch nur in Bezug auf makrozyklische Trichothecene beschrieben (Ulrich et al., 2019).

Bekannte Atranone von *S. chartarum* Chemotyp A und *S. chlorohalonata* sind die Atranone A-K (s. Abbildung 3), deren chemische Strukturen sich in den variablen Resten unterscheiden (Hinkley et al., 1999; Hinkley et al., 2000; Hinkley et al., 2003).

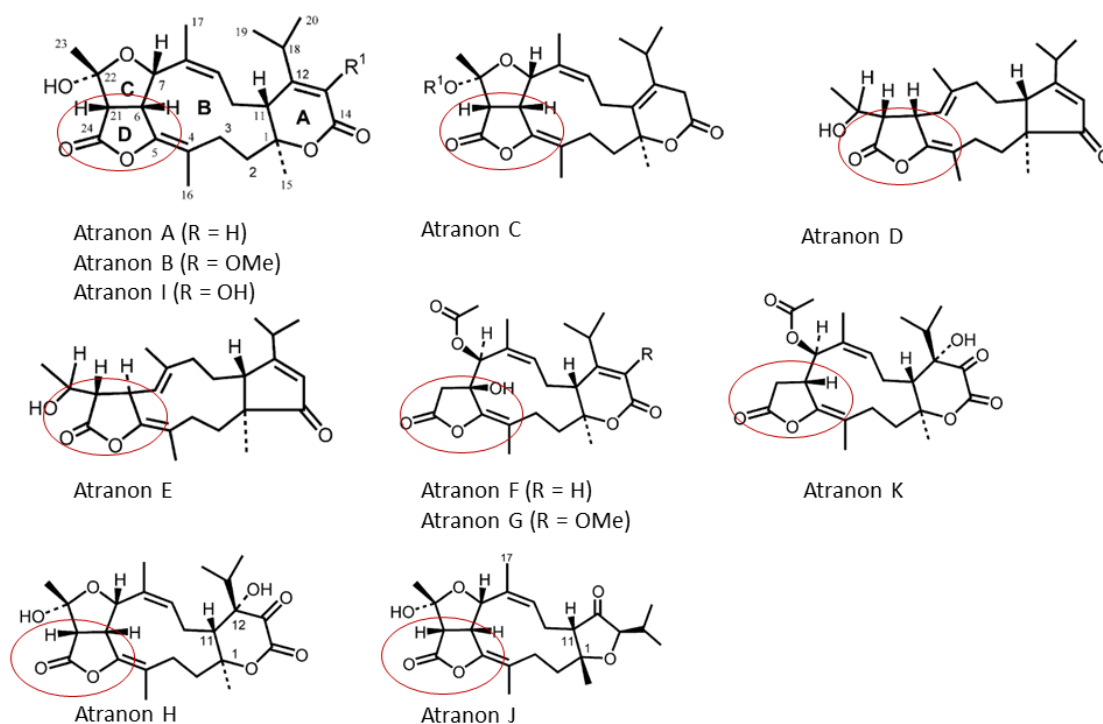


Abbildung 3: Strukturformeln der Atranone A-K (nach Jarvis, 2003),
Rot: eingekreistes Enol-Lacton-System

Für Atranone ist eine immunmodulatorische Wirkung bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass die intratracheale Applikation der Atranone A und C (2-20 µg/Tier) bei Mäusen zu einem dosisabhängigen Anstieg der Entzündungsmediatoren Interleukin-6, TNF-α und Makrophagen führt (Rand et al., 2006).

Außerdem konnte für drei neu beschriebene Atranone, die von *S. chartarum* gebildet werden, eine inhibitorische Wirkung auf *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* sowie Methicillin-resistente Spezies von *Staphylococcus aureus* in-vitro nachgewiesen werden (Yang et al., 2019).

2.1.3.3 Phenylspirodrimane

Phenylspirodrimane gehören zu den Meroterpenoiden, wovon über 80 verschiedene Substanzen von *Stachybotrys* spp. gebildet werden. Die polyzyklisch aufgebauten Metaboliten sind über eine Spiroverbindung (s. Abbildung 4) miteinander verbunden (Nielsen, 2003; Wang et al., 2014).

Sie bilden den größten und vielfältigsten Anteil am Metabolitenprofil der Gattung *Stachybotrys*. Der Chemotyp S von *S. chartarum* produziert eine größere Auswahl an Phenylspirodrimananen als *S. chlorohalonata*. Die Gesamtkonzentration der Toxine ist aber geringer (Jagels et al., 2019; Jarvis et al., 1995).

Aus *S. chartarum*-Isolaten können kontinuierlich neue Phenylspirodrimane isoliert werden (Liu et al., 2020; Zhang et al., 2018).

Für Vertreter dieser Gruppe von Sekundärmetaboliten wie Stachybotrylactam und -lacton (s. Abbildung 4) sind folgende toxische Wirkungen bekannt: Inhibition proteolytischer Enzyme, des Komplementsystems und der Ausschüttung von TNF- α . Zudem können sie die Thrombolyse und Fibrinolyse stimulieren sowie zytotoxisch und neurotoxisch wirken (Hinkley et al., 1999; Nielsen, 2003).

Phenylspirodrimane zeigen auch immunmodulatorische Wirkungen und antivirale Eigenschaften (Bao et al., 2015; Li et al., 2017a; Li et al., 2017b; Li et al., 2014; Zhang et al., 2017).

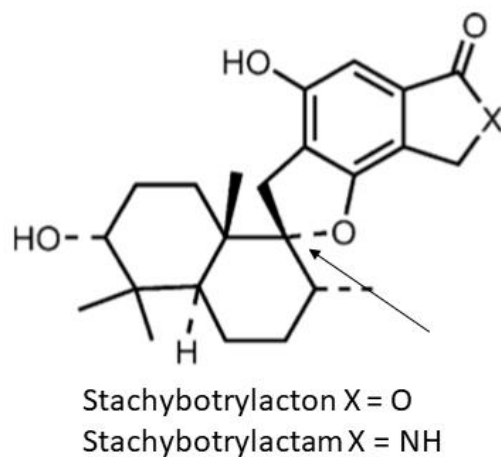


Abbildung 4: Strukturformeln von Stachybotrylacton und Stachybotrylactam (nach Jarvis, 2003), Pfeil: Spiroverbindung

2.1.4 Vorkommen und medizinische Bedeutung

Stachybotrys spp. sind ubiquitär vorkommende Schimmelpilze, die aufgrund ihrer Zellulaseaktivität vor allem auf zellulosehaltigen Materialien wachsen (McQuade, 1963; Nielsen et al., 1998). Dabei bevorzugen sie welkende und feuchte Matrices wie zellulosehaltige Baustoffe und Futtermittel, z.B. Heu und Stroh (Hintikka, 1977; Jarvis et al., 1983; Nielsen et al., 1998; Nikulin et al., 1994).

2.1.4.1 Futtermittel

Sowjetische Wissenschaftler beschrieben zum ersten Mal den Zusammenhang zwischen einer Erkrankung bei Pferden und der Aufnahme von schwärzlich verschimmeltem Heu. Bis zu den Untersuchungen von Forgacs et al. (1958) waren dies die einzig verfügbaren Beschreibungen von Erkrankungen durch *Stachybotrys* spp..

Die Untersuchungen wurden nach Vorfällen im Jahre 1931 durchgeführt, bei denen Pferde sowjetischer Soldaten nach der Ingestion von schwarz verschimmeltem Stroh verstarben (Drobotko, 1945).

Im Jahr 1947 konnte Sarkisov *S. chartarum* aus Stroh in einem von Stachybotryotoxikose betroffenen Betrieb isolieren (Forgacs, 1972). In späteren Untersuchungen konnten schließlich die für die Stachybotryotoxikose verantwortlichen makrozyklischen Trichothecene nachgewiesen werden (Harrach et al., 1983).

Heu und Stroh gelten als die besten Nährmedien für *S. chartarum* (Bars und Bars, 1991; Dankó, 1975; Harrach et al., 1987).

In den folgenden Jahrzehnten wurden Stämme von *Stachybotrys* spp. aus Futtermitteln isoliert und dabei mit Erkrankungen von Tieren in Verbindung gebracht (s. Tabelle 4). In aktuelleren Studien liegt der Fokus auf dem Vorkommen von *Stachybotrys* spp. in Innenräumen nach Wasserschäden und den daraus resultierenden gesundheitlichen Risiken für Menschen. Fallberichte zum Auftreten der Stachybotryotoxikose bei Tieren wurden nicht mehr veröffentlicht.

Tabelle 4: Nachweise von *Stachybotrys* spp. im Zusammenhang mit dem Auftreten von Stachybotryotoxikose bei Pferd, Rind und Schaf

Betroffene Tierart	Matrix	Land	Referenz
Pferd	n.b.	Ungarn	Jarmai (1929)
Pferd	Heu / Stroh	Ukraine	Drobotko et al. (1946)
Pferd	n.b.	Ukraine	Shulyumov et al. (1960)
Pferd / Rind	Stroh	n.b.	Fortuskny (1959)
Rind	n.b.	n.b.	Levenberg et al. (1961)
Pferd	Gerstenstroh	Ungarn	Dankó (1975)
Schaf	Weizen- und Gerstenstroh	Südafrika	Kriek und Marasas (1983)
Pferd	Stroh	Ungarn	Harrach et al. (1987)
Pferd	Heu	Deutschland	Launer et al. (1987)
Pferd	Stroh	Frankreich	Lefebvre et al. (1994)
Pferd	Stroh	Südafrika	Botha und Naudé (2002)

n.b.: nicht beschrieben

Neben den o.g. Nachweisen von *Stachybotrys* spp. mit dem Auftreten der Stachybotryotoxikose, gibt es zahlreiche Nachweise in Futtermitteln ohne Bezug auf Erkrankungen bei Menschen oder Tieren.

Kluwe (2006) konnte das Vorkommen von verschiedenen *Stachybotrys*-Isolaten in 32 Heu- und Strohproben aus deutschen Pferdeställen nachweisen. Dabei waren einige Isolate in der Lage, makrozyklische Trichothecene zu bilden.

In Rumänien wurde *Stachybotrys* neben zahlreichen anderen Gattungen in Stroh aus der Schweinezucht nachgewiesen (Miclea et al., 2012).

Stachybotryotoxikose beim Pferd

Die Stachybotryotoxikose wird zum ersten Mal in den Überlieferungen zur mongolischen Invasion in Russland im 13. Jahrhundert erwähnt (Dankó, 1975).

Die mongolischen Truppen waren zum Rückzug genötigt, da ihre Pferde plötzlich zahlreich verstarben. Die Pferde hatten schimmelndes Stroh von den Reetdächern in den russischen Dörfern gefressen, das wahrscheinlich mit einem toxinbildenden Stamm von *S. chartarum* kontaminiert war (Dankó, 1975).

In Ungarn wurde 1929 erstmalig eine Erkrankung beschrieben, die bei Pferden unter anderem zu Nekrosen und Geschwüren sowie plötzlichen Todesfällen führte. Die Diagnose lautete damals Pyoseptikämie (Dankó, 1975; Jarmai, 1929).

Zwei Jahre später kam es in der Ukrainischen Sozialistischen Sowjetrepublik durch verschimmeltes Stroh zu plötzlichen Todesfällen bei Pferden, die als „NZ“ (neizvestnoe zabolevanie - unbekannte Erkrankung) oder „MZ“ (massovoe zabolevanie - Massenerkrankung) bezeichnet wurde (Dankó, 1975; Forgacs, 1972).

Bei der Erforschung der Ursache gelang es im Jahre 1938, *S. chartarum* aus Stroh in betroffenen Pferdebeständen nachzuweisen und somit erstmals eine Verbindung zwischen Schimmelpilz und Auftreten der Erkrankung herzustellen (Forgacs, 1972).

Beim klinischen Verlauf werden drei Formen unterschieden: die typische und atypische Form sowie die Schockform, wobei die typische Form in drei Stadien untergliedert wird (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: Klinischer Verlauf der Stachybotryotoxikose beim Pferd nach Forgacs (1972)

Verlaufsform	ggf. Stadium	Dauer	Symptome
Typisch	1	8-30 Tage	Stomatitis oberflächliche und tiefe Risse im Maulwinkel Ödeme im Kopfbereich
	2	5-20 Tage	Koagulopathie Thrombozytopenie Lymphopenie
	3	1-6 Tage	Thrombozytopenie Lymphopenie Hyperthermie bis 41,5 °C Nekrosen im Maulbereich Apathie Schwacher Puls Tod
Atypisch	-	k.A.	Störung des Nervensystems verminderte Reflexe Hyperästhesie Schluckstörung Tod durch Aussetzen der Atmung
Schockform		10-12 Stunden	Hyperthermie bis 41 °C Zyanose Hämorrhagien an sichtbaren Schleimhäuten schwacher Puls

k.A. = keine Angabe

Die Ausprägung und der Verlauf der Stachybotryotoxikose beim Pferd hängen von der aufgenommenen Toxinmenge und dem Zeitraum, über den die Aufnahme erfolgte, ab (Forgacs, 1972).

Nicht alle Stämme von *S. chartarum* sind Toxinbildner, sie können aber auf geeigneten Nährmedien dazu in der Lage sein (Forgacs et al., 1958).

Stachybotryotoxikose bei anderen Tierarten

Die durch makrozyklische Trichothecene hervorgerufene Stachybotryotoxikose kann auch andere Tierarten betreffen. Symptome und Krankheitsverlauf ähneln dabei denen beim Pferd; Rinder scheinen resistenter (Forgacs et al., 1958).

In der Literatur sind Fälle bei Rindern, Schafen und Schweinen beschrieben (Dankó, 1975; Forgacs, 1972; Harrach et al., 1983; Schneider et al., 1979). Bei einem Bison und einem Nilpferd in einem Zoo wurde Stachybotryotoxikose diagnostiziert (Tkachenko, 1960). Ferner ist diese Erkrankung bei Hühnern beschrieben worden (Askalonov, 1949;

Sarkisov, 1954).

In verschiedenen Publikationen konnte die Stachybotryotoxikose durch die Fütterung von gezielt mit *S. chartarum* kontaminiertem Futter experimentell ausgelöst werden (Palyusik, 1970; Schumaier et al., 1963). Des Weiteren konnten im Tierversuch Symptome bei Mäusen, Meerschweinchen, Hasen und Hunden ausgelöst werden (Korneev, 1948).

2.1.4.2 Lebensmittel

Stachybotrys spp. wurden aus folgenden Produkten der Agrarwirtschaft isoliert: Erbsen, Gerste, Weizen, roter Pfeffer und Sojabohnenwurzeln (Abdel-Hafez und El-Said, 1997; Korpinen und Ylimäki, 1972; Li et al., 2002). Abdel-Hafez und El Nagggar (2006) isolierten *S. chartarum* aus medizinischen Heilpflanzen, wobei andere Gattungen wie *Alternaria* spp. und *Cladosporium* spp. einen deutlich größeren Anteil an der insgesamt nachgewiesenen *Mykobiota* hatten.

S. chartarum, *S. chlorohalonata* sowie makrozyklische Trichothecene konnten in einer Studie in getrockneten Kräutern nachgewiesen werden (Biermaier et al., 2015). Ansonsten konnten die Mykotoxine in verschiedenen Lebensmittelmatrizes nicht nachgewiesen werden (Barthel et al., 2012; Gottschalk et al., 2009; Sulyok et al., 2010; Xavier und Scussel, 2008).

2.1.4.3 Wohn- und Arbeitsräume

Stachybotrys wurde zum ersten Mal nach der Isolation von einer Tapete beschrieben (Corda, 1837). Inzwischen ist bekannt, dass *S. chartarum* wiederholt in feuchtigkeitsgeschädigten Innenräumen aus Luftfiltern, Möbeln, Tapeten oder auch Gipskartonplatten isoliert werden konnte (Andersson et al., 1997; Gareis, 1994; Gottschalk et al., 2009; Hunter et al., 1988; Johanning, 1994; Nolard, 1999).

Den ersten Nachweis für die Pathogenität gegenüber Menschen lieferte ein Humanexperiment, in dem sowjetische Wissenschaftler hochgradig kontaminiertes Stroh auf ihre Haut auftrugen und die resultierende Reaktion in Zusammenhang zu den Toxinen setzen konnten (Drobotko, 1945; Forgacs, 1972).

Bei den Nachweisen von *Stachybotrys* spp. aus Wohn- und Arbeitsräumen konnte mehrfach ein Zusammenhang zu Krankheitssymptomen bei Menschen hergestellt werden (s. Tabelle 6) (Andersson et al., 1997; Dill et al., 1997; Gareis, 1994; Johanning, 1994; Nolard, 1999).

Stachybotrys spp. wurden wiederholt mit Fällen von respiratorischen und neurologischen Symptomen beim Menschen in Verbindung gebracht (Dearborn et al., 2002; Dearborn et al., 1999; Johanning und Landsbergis, 1999; Koskinen et al., 1995; Scheel et al., 2001).

Für den Menschen besteht folglich ein Gefährdungspotential durch *Stachybotrys* spp. beim Umgang mit verschimmelten Futterproben, bei Sanierungsarbeiten oder längerem Aufenthalt in Innenräumen nach Feuchteschäden über die inhalative Exposition und auch den direkten Kontakt (Hintikka, 1977; Johanning, 1994).

Es konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen Materialien aus schimmelbefallenen Innenräumen hohe Mengen an makrozyklischen Trichothecenen nachweisbar sind (Bloom et al., 2007; Gottschalk et al., 2006, 2008; Lanier et al., 2012; Nielsen et al., 1998; Tuomi et al., 2000). Die inhalative Exposition resultiert aus der Bildung von Guttationströpfchen, die makrozyklische Trichothecene enthalten (Gareis et al., 2011).

Die Symptome, die nach Aufenthalt in schimmelbefallenen Innenräumen (s. Tabelle 6) auftreten, werden unter dem Symptomkomplex „Sick Building Syndrome“ (SBS) zusammengefasst (Aditama und Andarini, 2002; Johanning und Landsbergis, 1999; Lorenz et al., 2013; Redlich et al., 1997; Sabir et al., 1999).

Stachybotrys spp. gehören zu den vielzähligen Auslösern des SBS (Dearborn et al., 1999; Johanning, 1999; Scheel et al., 2001). Die Ursachen des SBS sind multifaktoriell; begünstigend wirken hohe Luftfeuchtigkeit, Exposition zu Mykotoxinen, Bioaerosolen und bakteriellen Endotoxinen sowie physischer und psychischer Stress (Aditama und Andarini, 2002; Engvall et al., 2001; Kuhn und Ghannoum, 2003; Li et al., 1997; Ooi und Goh, 1997; Trout et al., 2001).

In den 1990er Jahren erreichte der Schimmelpilz besondere mediale Aufmerksamkeit durch die retrospektiv hergestellte Verbindung zu Erkrankungen im Zeitraum von 1993 bis 1998 bei 37 Neugeborenen in Cleveland (Ohio, USA), wovon zwölf verstarben (Dearborn et al., 2002; Dearborn et al., 1999). In anderen Studien geht man im Zeitraum von Januar 1993 bis Dezember 1994 von zehn Kindern aus, die an pulmonaler Hämosiderose gestorben sind (Etzel et al., 1996; Etzel et al., 1998). Ein Großteil der betroffenen Kinder lebte in Häusern, die mit toxinbildenden *S. chartarum*-Stämmen befallen waren (Etzel et al., 1996).

Spätere Datenauswertungen ergaben, dass das als Stachylysin bezeichnete Hämolysin ebenfalls an den gesundheitlichen Folgen beteiligt war.

Retrospektiv konnte nicht immer ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von makrozyklischen Trichothecenen und dem Ausbrechen der pulmonalen Hämosiderose hergestellt werden (Jarvis et al., 1998; Vesper et al., 2000a; Vesper et al., 2001; Vesper und Vesper, 2002).

Tabelle 6: Übersicht zum Vorkommen von *Stachybotrys* in Wohn- und Arbeitsräumen im Zusammenhang mit Krankheitssymptomen beim Menschen

Symptome	Betroffene	Matrix	Referenz
Atemwegsbeschwerden Irritation der Schleimhäute dermatologische Beschwerden Blutungen	Versuchspersonen	Pilzextrakte Stroh	Drobotko (1945)
Stachybotryotoxikose	Landarbeiter	Staub Landwirtschaft	Hintikka (1978)
pulmonale Hämosiderose	Kleinkinder	Luftfilter	Etzel et al. (1998) Montaña et al. (1997)
Atemwegsbeschwerden chronisches Erschöpfungssyndrom Blutbildveränderungen Irritation der Augenschleimhaut dermatologische Beschwerden	Büroangestellte	verschimmelter Papier	Johanning et al. (1996)
Irritation von Augen- und Nasenschleimhaut	Handwerker	Baumaterial Innenraum	Andersson et al. (1997)
dermatologische Beschwerden Irritation der Schleimhäute respiratorische Beschwerden ZNS-Störungen	Büroangestellte	Luftfilter	Johanning et al. (1998)
pulmonale Beschwerden	Mitarbeiter des Gerichts	Luftfilter	Hodgson et al. (1998)
„Sick-Building“-Syndrom	Anwohner	Baumaterial Innenraum	Engvall et al. (2001)
Irritation der Augen- und oberen Atemwegsschleimhäute Kopfschmerzen	Anwohner	Baumaterial Innenraum	Usleber et al. (2001)
„Sick-Building“-Syndrom	Schüler Lehrer	Baumaterial Innenraum	Scheel et al. (2001)
Irritation der Augen- und oberen Atemwegsschleimhäute Kopfschmerzen	Anwohner	Luftfilter	Mussalo-Rauhamaa et al. (2010)

ZNS: Zentralnervensystem n.b.: nicht beschrieben

2.2 Methoden zur Differenzierung

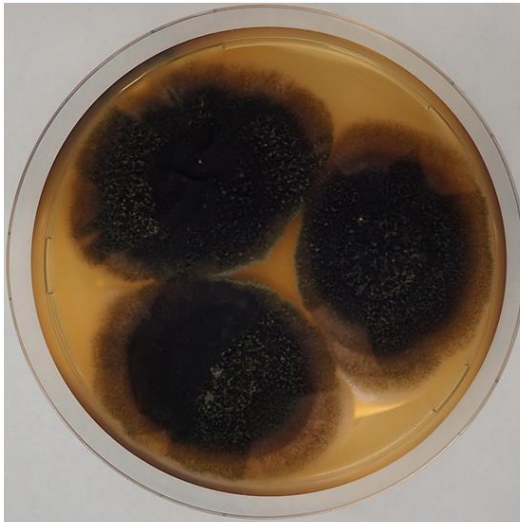
2.2.1 Kultur- und Mikromorphologie

Für die Anzucht von *Stachybotrys* spp. werden folgende Festnährmedien verwendet: Corn Meal Agar (CMA), Malzextrakt-Agar (MEA), Potato Dextrose Agar (PDA) und Cellulose Agar (Hess-Kosa, 2018; Samson, 2010).

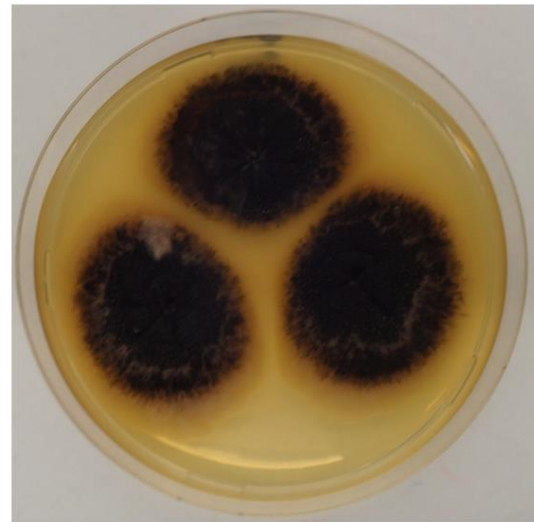
Außerdem können *Stachybotrys* spp. auf einem mit Van-Iterson-Medium befeuchteten, sterilen Papierfilter angezüchtet werden. Bei dieser Anzüchtmethode hat die Gattung einen Selektionsvorteil, da sie in der Lage ist, die Zellulose im Papierfilter als Kohlenhydratquelle zu nutzen. Bei der Untersuchung von Proben aus Lebens- und Futtermitteln sowie der Umwelt auf den o.g. Standardnährmedien werden *Stachybotrys* spp. von schneller wachsenden Schimmelpilzgattungen überwachsen (Bata et al., 1985; Hintikka, 1977; McQuade, 1963).

S. chartarum bildet sowohl auf MEA als auch auf PDA gräulich-schwarze Kolonien; es kann auch ein orange-braunes Pigment entstehen (s. Abbildung 5) (Andersen et al., 2003; Samson, 2010).

In mikroskopischen Präparaten stellen sich bei *S. chartarum* aufgerichtete Konidiophoren dar, die ein bis zwei Verzweigungen aufweisen. Die obovoiden Phialiden haben eine glatte Oberfläche (Andersen et al., 2003; Wang et al., 2015). Die Konidien sind rau und ellipsoid, teilweise auch obovoid. Sie können von einer Schleimkapsel umgeben sein (s. Abbildung 6) (Andersen et al., 2003; Samson, 2010; Wang et al., 2015).



S. chartarum nach 21 Tagen auf MEA



S. chartarum nach 21 Tagen auf PDA

Abbildung 5: Typische schwarze Dreipunktkolonien von *S. chartarum* nach 21 Tagen Anzucht auf MEA und PDA (eigene Aufnahmen)

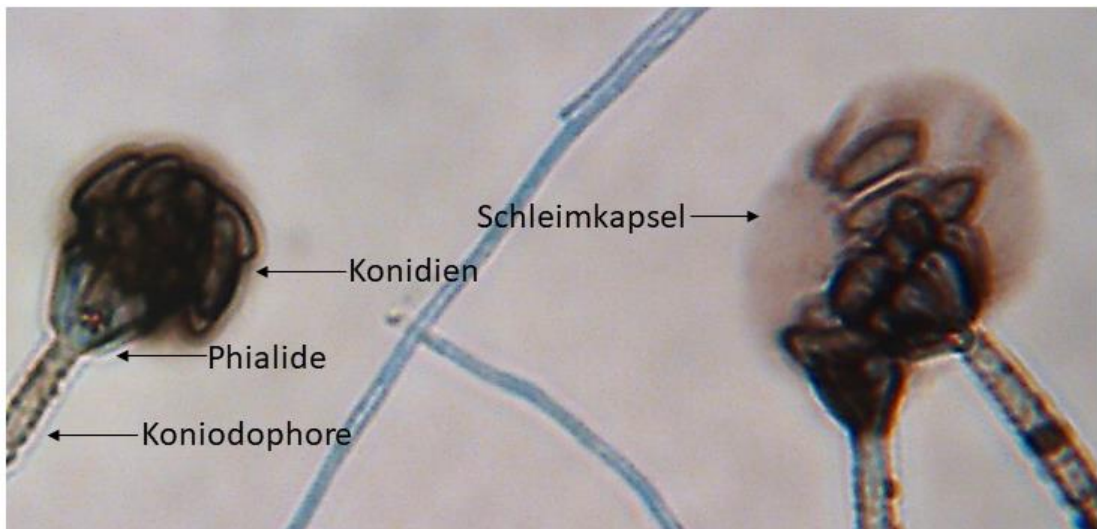


Abbildung 6: Lichtmikroskopaufnahme von *S. chartarum* in 400-facher Vergrößerung (Klebestreifenpräparat, Anilinblaufärbung, eigene Aufnahme)

2.2.2 Molekularbiologie

Für die Genotypisierung von *S. chartarum* wird die Polymerasekettenreaktion (PCR) mit anschließender Sequenzierung eingesetzt. Die Zuordnung zum Reich der Fungi erfolgt durch die Sequenzierung des ribosomalen Genabschnittes für den internal transcribed spacer (ITS)-Abschnitt (Hibbett und Taylor, 2013; Schoch et al., 2012).

Für die Identifizierung von *S. chartarum* werden ITS 1 / 4, ITS 1 / 2 sowie das 18 S rRNA-Gen genutzt (Cruz-Perez et al., 2001; Haugland und Heckman, 1998; White et al., 1990; Zhou et al., 2000).

Die Arbeitsgruppe von Cruse et al. (2002) differenzierte anhand von drei Genabschnitten zwei phylogenetische Gruppen von *S. chartarum*.

Mithilfe des Trichodiensynthase 5- (*tri5*), des Chitinsynthase (*chs-1*) und des beta-tubulin 1 (*tub 1*)-Genabschnittes konnten zwei Chemotypen von *S. chartarum* und eine weitere Spezies, *S. chlorohalonata*, unterschieden werden (Andersen et al., 2003).

Die Abgrenzung der beiden Chemotypen (A und S) ist anhand der Metabolitenproduktion und jeweils eines ausgetauschten Nukleotids in der *tub1*- und der *chs1*-Region möglich (Andersen et al., 2003). Die beiden Spezies *S. chlorohalonata* und *S. chartarum* weichen im *tri5*-Genabschnitt in 28, im *tub1*-Abschnitt in 27 und im *chs1*-Genabschnitt in neun Nukleotidpositionen voneinander ab (Andersen et al., 2003).

Das Metabolitenprofil und damit die Chemotypen von *S. chartarum* werden von Genclustern definiert. Der Regulationsmechanismus für die Chemotypenentwicklung konnte bisher nicht geklärt werden (Semeiks et al., 2014).

Es konnte gezeigt werden, dass einige Isolate von *S. chartarum* Chemotyp S keine makrozyklischen Trichothecene bilden. Anhand des Nachweises der Atranon- und Satratoxin-Gencluster mittels Multiplex-PCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese konnte *S. chartarum* in drei Genotypen unterteilt werden. Neben den bisher definierten Atranon- und Satratoxintypen wurde ein Hybridtyp (Genotyp H) identifiziert, bei dem nur ein unvollständiger Satratoxin-Gencluster mit den Abschnitten SC1 und SC3 nachweisbar ist (Ulrich et al., 2019).

2.2.3 Infrarotspektroskopie

2.2.3.1 Prinzip

Die Infrarotspektroskopie ist ein physikalisches Analyseverfahren der Molekülspektroskopie, das auf der energetischen Anregung von Molekülen basiert. Dabei wird Strahlung der Wellenlängen 780 nm bis 1 mm angewandt, die als Infrarotstrahlung bezeichnet wird.

Es können Substanzen aller Aggregatzustände mit der Infrarotstrahlung durchleuchtet werden. Dabei wird das Verhältnis zwischen durchgelassener und eingedrungener Strahlung, auch Transmission genannt, bestimmt (Günzler und Gremlich, 2012).

Da die Transmission von den Molekularbindungen abhängt und damit individuell für jede Substanz ist, können indirekte und direkte Aussagen bei der Identifizierung getroffen werden. Direkte Aussagen basieren auf dem Zusammenhang zwischen Strukturgruppen (z.B. Doppelbindungen, Hydroxygruppen) und Absorptionsbanden in den generierten Spektren. Anhand empirischer Daten kann das Vorhandensein oder Fehlen bestimmter Molekülbindungen aus den Absorptionsbanden abgeleitet werden (Colthup, 2012; Lin-Vien et al., 1991).

Die indirekte Identifizierung beruht auf der Anwendung der sogenannten Fingerabdruck-Region ($1500\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$), die dem Kohlenstoffgerüst des Moleküls zugeordnet ist. Die stoffspezifischen Absorptionsbanden können mit kommerziell erhältlichen Spektrenbibliotheken abgeglichen werden (Günzler und Gremlich, 2012).

Der Transmissionsgrad bei einer bestimmten Wellenlänge ist für jede Substanz spezifisch, was auch quantitative Analysen ermöglicht. Die Voraussetzungen dafür sind, dass keine Beeinträchtigungen der Messungen durch Aggregations-Effekte und Lösungsmittel vorliegen. Die Spurenanalyse mit der Infrarotspektroskopie ist bereits bei Konzentrationen unter 0,1 % möglich. Da die Messgeräte in der Regel mit einem Rechner verbunden sind, können auch aufwändige Mehrkomponentenanalysen durchgeführt werden (Günzler und Gremlich, 2012).

2.2.3.2 FT-IR-Spektroskopie

In einem Fourier-Transformations-Infrarot-Spektrometer (FT-IR; Grundaufbau s. Abbildung 7) wird breitbandige Infrarot-Strahlung von einer Strahlenquelle ausgesandt, die auf einen Strahlteiler trifft. Der Strahlteiler lässt eine Hälfte des auftreffenden Lichts durch, wohingegen die andere Hälfte wieder reflektiert wird. Der reflektierte Teil der Strahlung wird auf einen fest montierten Spiegel geleitet, der diesen wieder auf den Strahlteiler reflektiert (Herres und Gronholz, 1984).

Der dann durch einen beweglichen Spiegel modulierte Strahl verlässt das Interferometer des FT-IR, passiert die Probe und wird von einem Detektor registriert. Dabei kann jede Position des beweglichen Spiegels einer bestimmten Wellenlänge zugeordnet werden (Günzler und Gremlich, 2012; Herres und Gronholz, 1984).

Das Interferogramm wird von dem Detektor registriert und in einem angeschlossenen Computer wird über Fourier-Transformation bestimmt, mit welcher Intensität bestimmte Wellenzahlen auftreten. Es wird das sogenannte Einkanalspektrum generiert. Das endgültige Spektrum ergibt sich aus dem Verhältnis des Einkanalspektrums zu einer Referenz. Bei der Referenz handelt es sich um die Messung der Messplatte ohne Probenmaterial („Background“) (Günzler und Gremlich, 2012; Herres und Gronholz, 1984).

Die FT-IR-Spektrometer haben gegenüber den konventionellen Infrarotspektrometern vier Vorteile (Herres und Gronholz, 1984):

1. Der gesamte Spektralbereich trägt bei jeder Messung zum Signal bei, da stets alle von der Strahlenquelle ausgesandten Frequenzen auf den Detektor treffen. Somit überträgt sich das Rauschen auf sämtliche Spektralbereiche, was zu einem verbesserten Signal/Rausch-Verhältnis führt.
2. Die vollständigen Spektren können innerhalb von Sekundenbruchteilen generiert werden, da die Spiegel sehr schnell bewegt werden können. In konventionellen Geräten ohne Interferometer werden dazu Minuten benötigt.
3. In dieser Art von Spektrometern werden kreisförmige Aperturen verwendet, die dazu führen, dass der Strahlungsdurchsatz mindestens um den Faktor 6 erhöht ist.
4. Die Wellenzahlgenauigkeit ist direkt mit der Positionsbestimmung des beweglichen Interferometerspiegels gekoppelt. Mit Hilfe eines Helium-Neon-

Lasers kann die Position des beweglichen Spiegels auf $0,005\text{ }\mu\text{m}$ genau bestimmt werden, sodass auch geringfügige Differenzen in Spektren ermittelt werden können.

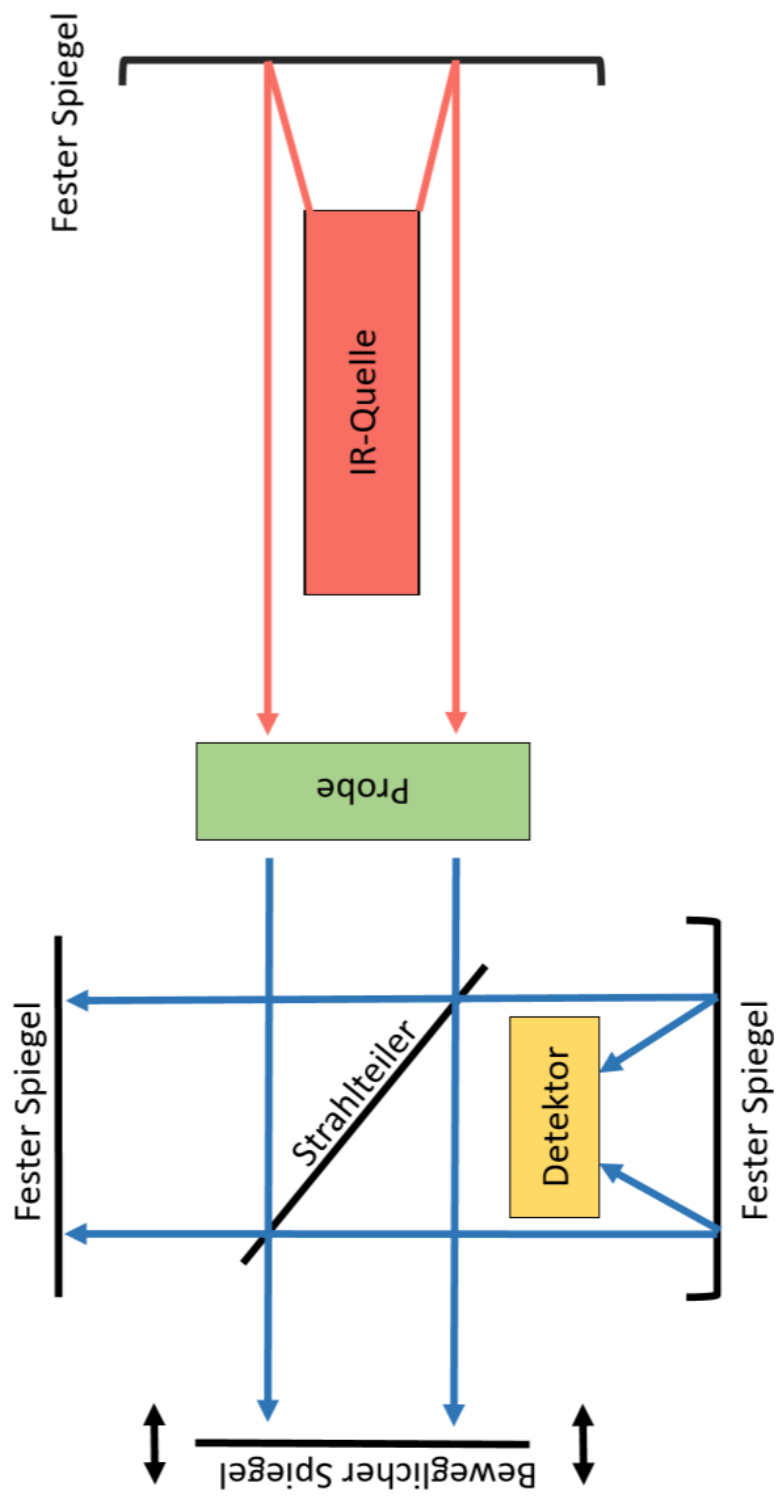


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Infrarot-Spektrometrie (nach Röhr, 1997)

Naumann et al. (1988) zeigten, dass die FT-IR-Spektroskopie auch für die Identifikation verschiedener Bakterien anhand der Spektren geeignet ist. Dies beruht auf der Tatsache, dass auch die molekularen Verbindungen innerhalb eines Mikroorganismus die Infrarotstrahlung unterschiedlich intensiv absorbieren und sich ein individueller Fingerabdruck ergibt (Burgula et al., 2007; Naumann et al., 1991).

Im Falle des verwendeten FT-IR-Spektrometers und der zugehörigen Biotyper-Software werden die erzeugten Daten in ein Dendrogramm umgewandelt. So können Ähnlichkeiten von Proben zueinander oder auch von Proben zu Referenzorganismen dargestellt werden (N.N., 2017).

Zur Identifizierung klinisch relevanter Erreger werden die Mikroorganismen auf Festmedien angezüchtet, die keine optimalen Wachstumsbedingungen liefern, um die Bakterien auf gewisse Weise zu stressen, was die Ausprägung unterscheidungsrelevanter Charakteristika fördern soll (N.N., 2017).

Von den Festmedien kann bereits nach 24 Stunden mit Hilfe einer sterilen Einwegöse Material von konfluierenden Kolonien entnommen werden. Das entnommene Material wird dann in 70%-iges EtOH überführt, um die Mikroorganismen zuverlässig abzutöten.

Damit die Zellwände für die Analyse der Zellen zerstört werden können, wird die Probe nach der Zugabe von Metallperlen mit einem Vortexer bearbeitet. Zum Absenken der Oberflächenspannung wird noch Aqua bidest. hinzugefügt, was das Auftragen auf die 96-Messpunkte-Silizium-Mikrotiterplatte erleichtert. So wird die Konzentration der Probenflüssigkeit in der Mitte des Messpunktes verhindert und es ist sichergestellt, dass der gesamte Messpunkt mit Probenmaterial bedeckt ist. Nach der vollständigen Trocknung bei 37 °C kann das Probenmaterial gemessen werden (N.N., 2017).

Zu Beginn einer jeden Messung werden automatisch bakterielle Teststandards gemessen, anhand derer die Software die Funktionsweise des FT-IR-Spektrometers überprüft und sicherstellt. Ohne die erfolgreiche Kontrolle der Teststandards kann die Analyse mit dem FT-IR-Spektrometer nicht durchgeführt werden (N.N., 2017).

Sobald die Probenmessung abgeschlossen ist, werden die zu jedem Messpunkt erzeugten Spektraldaten automatisiert in Dendrogrammen hinterlegt. Dabei werden die zu einem Messpunkt hinterlegten Daten je nach ausgewählter Methode und Fragestellung in Beziehung zu den Daten eines anderen Messpunktes gesetzt (N.N.,

2017).

Bei der Methode „mean average linkage“ werden alle Einzelspektren eines Isolates zusammengefasst, sodass die Ähnlichkeiten im Dendrogramm übersichtlich dargestellt werden können. In der hierarchischen Clusteranalyse kann eine Aussage über die Zugehörigkeit verschiedener Mikroorganismen zueinander oder zu hinterlegten Referenzdaten getroffen werden. Bisher erhältlich sind Referenzdatenbanken für Bakterien und Hefen (N.N., 2017).

Die FT-IR Spektroskopie wird auch für die Identifizierung und Charakterisierung filamentöser Schimmelpilze genutzt (s. Tabelle 7).

Je nach zur Verfügung stehender apparativer Ausstattung können die Schimmelpilze anhand von Kulturmateriel von Fest- oder Flüssigmedien analysiert werden.

Die angewandte Methode der Arbeitsgruppe von Shapaval et al. (2010), bei der homogenisiertes Mycel aus Flüssigmedien zur Analyse benutzt wird, stellte sich als am besten geeignet für die Analyse von *S. chartarum* heraus.

In der Lebensmittelindustrie können auch verschiedene Inhaltsstoffe, wie z.B. Koffein in Limonaden (Paradkar und Irudayaraj, 2002) oder auch Rückstände von antibiotischen Wirkstoffen in Milch (Sivakesava und Irudayaraj, 2002) qualitativ und quantitativ mit Hilfe der FT-IR-Spektroskopie bestimmt werden.

Tabelle 7: Übersicht zur Identifizierung und Charakterisierung von Mikromyzeten mittels FT-IR Spektroskopie

Mycota	FT-IR-Spektrometer	Referenz
<i>Aspergillus</i> sp.	KVB/Analect (Irvine, CA) Modell RFX-75 Spektrometer, modifiziert für PAS mit MTEC (Ames, IA) Modell 200 mit photoakustischem Detektor	Gordon et al. (1998)
<i>Microsporum</i> sp., <i>Trichophyton</i> spp.	IFS-28B FT-IR-Spektrometer (Bruker Analytik GmbH, Karlsruhe)	Bastert et al. (1999)
<i>Fusarium</i> spp.	FT-IR-Spektrometer (Bruker) mit LADTGS Detektor und ATR (SensIR Technologies, USA)	Kos et al. (2002)
<i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.	IFS-28B FT-IR-Spektrometer (Bruker Optics GmbH, Ettlingen)	Fischer et al. (2006)
<i>Colletotrichum</i> sp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Verticillium</i> sp.	Spectrophotometer (Bruker Vector 22) mit DTGS-Detektor und ATR-Kristall (Pike Technologies)	Linker und Tsrör (2008)
<i>Alternaria</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Mucor</i> spp., <i>Paecilomyces</i> sp., <i>Phoma</i> sp.	HTS-XT mit Tensor 27 Spektrometer (Bruker Optik GmbH)	Shapaval et al. (2010)
<i>Fusarium</i> sp.	FT-IR-Spektrometer (Bruker Tensor 27) mit ATR	Salman et al. (2011)
<i>Alternaria</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Geotrichum</i> sp., <i>Mucor</i> spp., <i>Paecilomyces</i> sp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Phoma</i> sp., <i>Rhizopus</i> sp.	HTS-XT mit Tensor 27 Spektrometer (Bruker Optik GmbH)	Shapaval et al. (2013)
<i>Alternaria</i> sp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Aureobasidium</i> sp., <i>Cunninghamella</i> spp., <i>Emmericella</i> sp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Geotrichum</i> sp., <i>Lichtheimia</i> sp., <i>Mucor</i> spp.	FT-IR-Spektrometer (Tensor 27, Bruker Optics, Frankreich) mit HTS-XT-Modul (Bruker Optics)	Lecellier et al. (2014)
<i>Aspergillus</i> spp., <i>Byssosclamyces</i> sp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., u.a.	FT-IR-Spektrometer (Tensor 27, Bruker Optics, Ettlingen) mit HTS-XT-Modul	Gaydou et al. (2015)

FT-IR-Spektroskopie: Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie; PAS: photoakustische Spektroskopie; ATR: attenuated total reflexion; LADTGS: deuteriertes Triglycerinsulfat mit L-Alanin; DTGS: deuteriertes Triglycerinsulfat; HTS-XT: high throughput screening extension

3 Publikation

Mycopathologia

Received: June 17, 2020 | Accepted: September 23, 2020

DOI: 10.1007/s11046-020-00495-0 | Copyright 2020, Springer Nature, Switzerland AG

Differentiation of *S. chartarum* (Ehrenb.) S. Hughes chemotypes A and S via FT-IR spectroscopy

Julia Ekruth¹, Christoph Gottschalk¹, Sebastian Ulrich^{1,2}, Manfred Gareis¹, Karin
Schwaiger¹

¹Chair of Food Safety, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University Munich, Schoenleutnerstr. 8, 85764 Oberschleissheim, Germany

²Bacteriology and Mycology, Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Department of Veterinary Science, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University Munich, Veterinaerstr. 13, 80539 Munich, Germany

Corresponding author:

Julia Ekruth, Julia.Ekruth@ls.vetmed.uni-muenchen.de, Chair of Food Safety, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University Munich, Schoenleutnerstr. 8, 85764 Oberschleissheim, Germany

Abstract

Stachybotrys (S.) chartarum is a cellulolytic mould with the ability to produce highly cytotoxic macrocyclic trichothecenes. Two chemotypes are defined according to their ability to produce either atranones (A-type) or satratoxins (S-type). *S. chartarum* has been well-known as the causative agent of the lethal disease stachybotryotoxicosis in horses. Further investigations revealed that this disease is strictly correlated with the presence of macrocyclic trichothecenes. Furthermore, their occurrence in water-damaged buildings has been linked to adverse health effects such as the Sick Building Syndrome. As the chemotypes cannot be characterized via phenotypic criteria, different methods such as PCR, MALDI-TOF MS, LC-MS/MS, thin-layer chromatography and cytotoxicity assays have been used so far. Fourier-transform-infrared spectroscopy (FT-IR) is commonly used for the differentiation of bacteria and yeasts but this technique is also applicable to filamentous fungi. Hence, this study aimed at evaluating to which extent a reliable differentiation of *S. chartarum* chemotypes A and S is possible. Besides, another objective was to verify if the recently introduced third genotype of *S. chartarum* can be identified. Therefore, 28 strains including the two chemotypes and the third genotype H were cultivated on malt extract agar (MEA) and potato dextrose agar (PDA) in three biological replicates. Each sample was applied to FT-IR-measurements on day 7, 14 and 21 of cultivation. In this study, we achieved a distinction of the chemotypes A and S via FT-IR spectroscopy after incubation for 7 days on MEA. In terms of genotype differentiation, the PCR detecting satratoxin- and atranone-gene clusters remained the only applicable method.

Keywords *Stachybotrys chartarum*, macrocyclic trichothecenes, Triplex PCR, Fourier-transform-infrared-spectroscopy

List of abbreviations

FT-IR	Fourier-transform-infrared spectroscopy
LC-MS/MS	liquid-chromatography mass spectrometry
MALDI-TOF MS	matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry
MEA	malt extract agar
MEB	malt extract broth
PDA	potato dextrose agar
PDB	potato dextrose broth
<i>S.</i>	<i>Stachybotrys</i>

Introduction

Stachybotrys is a dematiaceous mould comprising 75 species [1, 2]. Due to its cellulolytic activity, it can mostly be isolated from hay, straw, damp building materials (e. g., gypsum board, wallpaper, wood), and culinary herbs [3-8]. It has firstly attracted scientific interest after numerous horses of the former Soviet military died after the ingestion of feed which was highly contaminated with this black mould [9]. This lethal disease was named stachybotryotoxicosis and further investigations identified highly cytotoxic macrocyclic trichothecenes as the actual causative agents [9, 10]. In terms of secondary metabolites, *S. chartarum* is also known to produce atranones and phenylspirodrimanones [11, 12]. The macrocyclic trichothecenes are suspected to cause severe health effects in humans as their occurrence has been linked to cases of sick building syndrome, hemorrhages in infants and other adverse health effects [13-18, 10]. *S. chartarum* is commonly divided into two chemotypes according to their ability to produce atranones (chemotype A) or satratoxins (chemotype S) [11]. In a recently published study, another nomenclature dividing *S. chartarum* isolates into three genotypes was proposed [19]. FT-IR spectroscopy has been successfully used for the identification and characterization of bacteria and yeasts as well as for the differentiation of moulds such as *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. and many others [20-26]. However, neither *S. chartarum* nor any other species of *Stachybotrys* have been part of FT-IR spectroscopy studies. An IR-spectrometer emits infrared radiation which penetrates the sample and the intensity of the infrared radiation is measured before and after passing through the sample. The intensity of transmission depends on the quantity and quality of the molecular bonds in the specific sample. In the following, the interferogram is converted into a unique infrared spectrum via Fourier-transformation [27]. Finally, the spectral data are converted into dendrograms and can be evaluated with the help of hierarchical cluster analysis based on the Euclidean distance [28].

This study aimed at the differentiation of *S. chartarum* chemotypes via FT-IR spectroscopy.

All the selected strains were initially characterized via PCR and then applied to FT-IR spectroscopic analysis. With this technology, the chemotypes A and S could be successfully distinguished after incubation for 7 days on malt extract agar (MEA).

Furthermore, the strains were also incubated on potato dextrose agar (PDA) to evaluate if one of the media was more suitable for reliable results.

Materials and Methods

Fungal isolates and culture conditions

In total, 28 strains of *S. chartarum* were examined in this study (Table 1). The isolates are divided into three sets: nine strains of chemotype A, nine strains of chemotype S and ten strains of genotype H. Among these five reference strains were purchased from CBS (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, The Netherlands), IBT (Culture Collection of Fungi, Denmark) and ATCC (American Type Culture Collection). The remaining 23 strains are field isolates and were selected from the in-house culture collection already characterized by different methods (MALDI-TOF MS, sequencing (tri5-fragment) and mycotoxin production by LC-MS/MS). All strains were either stored as lyophilisates or in 20 % glycerol as single-spore-isolates.

For all identification and characterization steps, the cultures were grown on malt extract agar (MEA, ready-to-use-mix, 48.0 g/L, Merck Darmstadt, Germany), and potato dextrose agar (PDA, ready-to-use-mix 39.0 g/L, VWR Darmstadt, Germany). Culture media were sterilized at 121 °C for 15 minutes before use. Working cultures were grown as three-point isolates for 21 days at 25° C and 95 % relative humidity. Each strain was cultivated in three biological replicates on both media. In total, six cultures per isolate were analysed with the methods explained below. For the preparation of liquid cultures for FT-IR-spectroscopy measurement, malt extract broth (MEB, ready-to-use-mix, 17.0 g/L, Merck Darmstadt, Germany), and potato dextrose broth (PDB, ready-to-use-mix, 24.0 g/L, VWR Darmstadt, Germany) were used. A photograph of each isolate has been taken and to confirm the determination of the prevailing genotype, the PCR based on the truncated satratoxin gene clusters has been carried out as described previously [19].

Isolation of fungal DNA and PCR products

For the isolation of fungal DNA, mycelia of seven days old cultures were transferred to an Eppendorf tube (Eppendorf, Hamburg, Germany) with 1000 µL ethanol. The extraction of DNA was performed with the NucleoSpin® Plant II-Kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) and a slightly modified instruction as described below. The samples

were centrifuged for 5 minutes at 14500 rpm (Mini Spin® Plus, Eppendorf, Hamburg, Germany, 12-well rotor, 17661 rcf) and the supernatant was removed, this step was repeated once. In order to achieve a better cleavage of cells, 150 mg of glass beads (diameter 1 mm, Bio-Spec Products, Karlsruhe, Germany) were added to the 400 µL Lysis buffer and the isolates were treated with a TissueLyser (Qiagen, Hilden, Germany) for 30 seconds (frequency: 30/sec) [7]. Ten µL diluted RNase (NucleoSpin® Plant II-Kit) and 5 µL protein kinase K (20 mg/mL, recombinant PCR grade, Roche, Basel, Switzerland) were added and the samples then incubated for 60 minutes at 65 °C (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg, Germany). The liquid samples were transferred to a new 1.5 mL reaction tube and after adding of 100 µL chloroform (Merck, Darmstadt, Germany) mixed for 20 sec and centrifuged for further 15 min at 14500 rpm. The supernatant was then gently transferred to a collection tube with a violet filter (NucleoSpin® Plant II-Kit) and centrifuged for 2 min at 11000 rpm (10164 rcf). In the following step, 450 µL PC buffer were added. The samples were transferred to a new collection tube with a green filter (NucleoSpin® Plant II-Kit) and centrifuged for 1 min at 11000 rpm. The green filter was washed with 400 µL washing buffer PW1 (centrifugation for 1 min at 11000 rpm). The last two washing steps were carried out with the washing buffer PW2 (600 µL and 1 min at 11000 rpm, 300 µL and 3 min at 11000 rpm). The filter was transferred to a new 1.5 mL reaction tube. Fifty µL elution buffer PE were added to the filter with the bound DNA and the samples were incubated for 5 min at 70 °C followed by a final centrifugation step (1 min at 11000 rpm). The elution step was repeated once. The DNA extracts were diluted with sterilized water to a final concentration of approximately 10 ng/mL. The concentrations were determined with a NanoDrop 1000 spectrophotometer (PeQlab, Erlangen, Germany). Until further analysis, the DNA extracts were stored at -20 °C.

PCR analysis of satratoxin and atranone cluster genes

The PCR was carried out using two pairs of primers (based on the genome sequences of the macrocyclic trichothecene producing strains IBT 40293, IBT 7711 and the atranone producing strain IBT 40288) as described in an earlier publication [19]. The master mix for 25 µL reactions consisted of the following components: 5 µL Green GoTaq Flexi Buffer (Promega, Mannheim, Germany), 2 µL MgCl₂ (0.25 mol/L, Promega, Mannheim, Germany), 2.5 µL dNTP (0.2 mol/L, Promega, Mannheim, Germany), 2 µL

of each primer (0.05 mol/L, Eurofins, Ebersberg, Germany), 0.25 μ L GoTaq G2 Flexi DNA polymerase (5 u/ μ L, Promega, Mannheim, Germany), sterile demineralized water up to 24 μ L. One microliter of genomic DNA (approximately 10 ng/ μ L) of the tested strains was added to the master mix. The PCRs were run in a Bio-Rad iCycler (Bio-Rad, Munich, Germany) using the following temperature protocol: initial melting at 95 °C, melting 30 sec at 95 °C, annealing at 58 °C for 20 sec, followed by elongation at 72 °C for 30 sec. The cycle of melting, annealing and elongation has been carried out thirty times. The final extension was carried out at 72 °C for 5 minutes. For final identification, the amplification products were separated on a 1.5 % (w/v) agarose gel (BioRad, Munich, Germany) in a TAE buffer (5%, Roth Karlsruhe, Germany). To mark the molecular weight, a 100 bp gene marker was used (HyperLadder, Bioline, Luckenwalde, Germany). Ethidium bromide (0.5 μ g/mL, VWR, Darmstadt, Germany) was used for visualisation. The gel was inspected in a UV chamber (Bio-Rad, Munich, Germany) and documented with a GelDoc software.

Sample preparation for FT-IR-spectroscopy

Mycelia and spores were taken from the working cultures after 7, 14 and 21 days of incubation with a sterile swab (dipped in the prevailing broth) and transferred into centrifuge tubes (15.0 mL Greiner Bio One, Frickenhausen, Germany) filled with 12.5 mL MEB or PDB to leave enough space for the mycelia to grow. The samples were incubated at room temperature on a rotary shaker for 4 days. On the 4th day of incubation, the tubes were put vertically for 5 minutes in order to let mycelia pellets settle to the bottom of the tube. The mycelia free broth was gently poured off. 1500 μ L of the liquid broth with mycelia pellets were transferred with a pipette (Eppendorf Reference 100-1000 μ L, Eppendorf Hamburg, Germany) to a 1.5 mL Eppendorf tube and centrifuged for 5 minutes at 13500 rpm (Labogene, Allerød, Denmark, 12-well rotor, corresponds to 18371 rcf). The supernatant was removed, and the step was repeated with 800 μ L of liquid broth. After another centrifugation step, the supernatant was removed again. 1000 μ L sterile aqua bidest. were added and vortexed for one minute. The samples were centrifuged at 13500 rpm for 5 minutes and the liquid was removed. This washing step was repeated twice. 50 μ L of ethanol (70 %) and four sterile metal beads (Bruker Daltonik GmbH, Germany) were added. To achieve a better cleavage of cells, the samples were treated with a TissueLyser (Qiagen, Hilden,

Germany) for 30 seconds at 30/s. Afterwards, the samples were treated with the short spin function to settle mycelia in the reaction tube and to avoid too much material in the lid. In order to reduce the surface tension, 50 µL sterile aqua bidest were added. The samples were vortexed for 30 sec and 15 µL of each sample were spotted on a 96-well microtiter plate (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). The microtiter plate was dried at 37 °C in an incubator until all technical replicates were entirely dried and applied to analysis. The instructions are also displayed as a flowchart in Online Resource 1.

Quality check of the sample material

Before each measurement, the applied sample material is evaluated regarding different criteria (e.g., absorption, signal-to-noise ratio). The quality check is obligatory and cannot be skipped. The spectral data can only be generated if this check is passed.

FT-IR-spectroscopy measurement and evaluation

FT-IR-spectroscopic measurements were performed with an IR Biotyper spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) following the Bruker Daltonik User's manual for FT-IR-spectroscopy (2017) except for the sample preparation protocol. For each strain, 6 technical replicates were prepared for measurement. The analysis of the generated data was performed with the Biotyper software (Version 1.5.0.90, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) and its automated settings. The spectra were recorded up to 1500 cm⁻¹ with a spectral resolution of 3 cm⁻¹ and an aperture of 10 mm. For each spectrum, 64 scans were averaged. The spectral data were automatically transformed into dendrograms using the average mean spectra method to maintain simplicity in the figures 3 and 4 [28].

Statistical data analysis

The statistical data analysis was carried out using the SPSS software (version 26.0). In order to determine the accordance between the genotype identification via PCR and the classification via FT-IR spectroscopy, the Cohen's Kappa values were calculated. The categorization of the Cohen's Kappa value by Landis, Koch [29] was applied to the statistical data as follows: <0.00 = poor; 0.00-0.20 = slight; 0.21-0.40 = fair; 0.41-0.60 = moderate; 0.61-0.80 = substantial; 0.81-1.00 = almost perfect accordance. Besides, the

statistical significance was calculated and is given as p-value. The results of the classification were interpreted as statistically relevant if the p-value was below 0.05. The corresponding results for each measurement are depicted in the description of the figures 3-4.

Results

This study aimed at the differentiation of the *S. chartarum* chemotypes. Therefore, 28 strains of *S. chartarum* were initially characterized via PCR to identify their satratoxin- and atranone gene clusters [19]. Moreover, the optimized sample preparation protocol was applied to these strains for their differentiation via FT-IR measurements. The results of the identification via PCR were compared with the chemotype characterization via FT-IR spectroscopy. The accordance of the results was defined with the help of Cohen's Kappa values [29].

Identification of S. chartarum isolates with triplex PCR

Recently, a new nomenclature for *S. chartarum* was introduced. *S. chartarum* isolates can be distinguished into three genotypes based on distinct gene clusters (atranone- and satratoxin-gene clusters). The newly introduced hybrid genotype H contains the complete gene set for atranone production but an incomplete set for macrocyclic trichothecenes and the first toxin analysis revealed no detectable macrocyclic trichothecenes [19]. Every strain has been cross-checked via PCR analysis based on the proposed new nomenclature. The results are summarized in table 1 and the actual visualization of the DNA fragments can be seen in figure 1. The size of the DNA fragments turned out as expected and each isolate could be classified as one of the two distinct chemotypes, the third genotype H respectively (S-type: 346 bp, A-type: 230 bp, H-type: both fragment sizes). In figure 2 representative cultures of the chemotypes and the hybrid genotype H are displayed. Neither the acknowledged chemotypes A and S nor the recently described genotype H possess phenotypic characteristics that enable a reliable distinction.

FT-IR spectroscopy

For the differentiation of the two chemotypes A and S, a classification in two distinct clusters was obtained after 7 days of incubation on MEA. All but one isolate (S 1493/1)

were correctly classified as chemotype A or chemotype S. The Cohen's Kappa value ($= 0.89$; $p < 0.01$) shows that the accordance in this case is "almost perfect" according to the categories of Kappa values (Fig. 2 a) [30, 29]. The prolongation of the incubation period resulted in a less correct differentiation and lower Cohen's Kappa values (Fig. 2 b, c). The Cohen's Kappa values decrease to 0.67 (day 14) and 0.78 (day 21; both "substantial accordance" [29]). Noticeably, the isolate S 1493/1 remains in the chemotype A-cluster after 14 and 21 days of incubation. Furthermore, after being incubated on MEA for 14 and 21 days, the isolate S BB2 is shifted from the chemotype S cluster to the chemotype A cluster. Besides, the strain S 1353 is correctly classified as chemotype A in Figure 2 a and c. Contrarily, after 14 days of incubation it is neither assigned to the chemotype A cluster nor to the genotype S cluster.

Due to the fact that cut-off values for the differentiation on the strain level are only defined for bacteria or yeasts, experimental cut-off values for the distinction of chemotypes were suggested [28]. Regarding the results for the incubation on MEA, the lowest suggested cut-off values are 0.05 in all three cases. Overall, the distinction levels fluctuate, but a distinction appears to be reliable, if the cut-off value is between 0.1 and 0.05. In comparison to cut-off values for the distinction of bacterial strains, the suggested values in this study are clearly lower [28]. To state an example, analysing *P. aeruginosa* with the basic IR-extraction and the settings used in the study at hand, the recommended cut-off values for a reliable distinction lie between 0.2 and 0.25 [28]. These low cut-off values for *S. chartarum* chemotypes result from the fact that only isolates of one species were analysed. The evaluation of the analyses aimed at the differentiation of *S. chartarum* strains on the subspecies level, chemotypes precisely. The results for the cultivation on PDA generally resulted in low Cohen's Kappa values (highest value on day 7: 0.44; "fair accordance" [29]). Furthermore, two clusters are only distinguishable after incubation for 7 days. The correct characterization of the two chemotypes is only "moderate" (0.44, Fig. 4 a) [29]. After further incubation for 14 and 21 days, even no main clusters are discernible (Fig. 4 b, c). Consequently, no reliable characterization was possible after cultivation of *S. chartarum* isolates on this type of agar.

The basic IR-extraction method had to be optimized in this study, because it is only adapted to bacteria and yeasts [28]. Thus, the basic IR-extraction protocol was replenished with further treatments. Avoiding sporulation and dark pigmentation, the

usual incubation of *S. chartarum* on solid media was followed by an incubation period in liquid media [31]. The samples continued to grow for four days in liquid medium and provided enough biomass for technical replicates. Further washing steps with ultrapure water were included in the optimized protocol to avoid contamination of the sample material by residues of the medium. An additional homogenization step finally enabled the measurement of the fungal sample material.

The evaluation of the measurements revealed that the hybrid genotype H cannot be distinguished from the low-cytotoxic chemotype A or from the highly cytotoxic chemotype S via FT-IR spectroscopy (Table 2).

Discussion

The two chemotypes of *S. chartarum* could be distinguished after incubation on MEA for 7 days, all but one isolate (S 1493/1) were characterized as the correct chemotype. As the amount of toxins increases over time, the correct categorization of the chemotypes was expected to increase simultaneously [32]. Unexpectedly, our results revealed that the number of falsely categorized isolates increased (Fig. 3). The most conspicuous isolates of the incubation period on MEA are S 1493/1, S BB2 and S 1353. The strain S 1493/1 is wrongly classified as chemotype A in all three cases, although it was confirmed to produce macrocyclic trichothecenes in previous LC-MS/MS analyses. The ability to produce cytotoxic toxins might not be the relevant criterion for distinction. In addition, various subcultivations of the strains might lead to mutations which modify the molecular bonds and the unique spectral data [33]. Contrarily, the strains S BB2 and S 1353 are characterized unequivocally over time as different chemotypes (Fig. 3). According to Shapaval et al. (2010), the spectral regions “fatty acids + lipid” ($3200\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$, $1300\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$) and “fingerprint” ($900\text{--}700\text{ cm}^{-1}$) are the most suitable for the distinction of species in hierarchical cluster analysis [25]. The study at hand covers most of the suggested spectral regions. The relevant regions for the differentiation of *S. chartarum* on the subspecies level might lie beyond these regions. Moreover, the ambiguous characterization of these isolates over time might result from unrevealed differences or characteristics. As far as we are informed, only one other study about FT-IR spectroscopy aimed at the distinction of fungal strains in terms of toxin production. Kaya-Celiker et al. successfully distinguished peanuts contaminated with non-toxic strains of *A. flavus* from those contaminated with toxic

strains. The method used was not applicable for this study as a completely different FT-IR system was used [34]. The phenomenon of isolates which are characterized differently below the species level has not been reported yet.

To evaluate the impact of the cultivation media, MEA and PDA were used because both media are commonly used in studies on the characterization of *Stachybotrys* spp. [11, 32, 35]. However, PDA turned out to be not suitable for the incubation of *S. chartarum* as already observed elsewhere [3].

As the treatment of fungal materials for FT-IR spectroscopic methods implies several difficulties, e.g., hydrophobic conidia, pigments or unstable biochemical characteristics of spores after the application of chemicals, various protocols for the sample preparation of different fungal species were developed [23, 25, 36]. The most applicable workflow included an additional incubation period in liquid medium and a homogenization step [25]. Thus, the amount of biomass was increased for technical replicates and the dark pigmentation was reduced. These optimizations finally enabled the application of FT-IR spectroscopic measurements to *S. chartarum*.

In this study, the subdivision of *S. chartarum* into three genotypes could not be confirmed via FT-IR spectroscopic measurements. However, regarding the results of the identification via PCR for satratoxin and atranone gene clusters, each strain could be identified as the expected chemotype or genotype. Above all, the previous differentiation of *S. chartarum* into a macrocyclic trichothecene type (chemotype S) and an atranone type (chemotype A) seems to be the most appropriate characterization when it comes to terms of FT-IR spectroscopic analysis [11].

To evaluate the health risk for humans, the reliable characterization of a *S. chartarum* isolate as chemotype S is very important as a first indication, but it does not allow a statement about the actual health risk. Exposure is depending on a variety of factors such as the general ability to produce mycotoxins which is influenced by various external factors, the amount of mycotoxins produced and finally the way of exposure (direct contact, ingestion, inhalation) [37, 38]. The methods of choice for the detection and evaluation of the toxic potential of *S. chartarum* strains remain LC-MS/MS and cytotoxicity testing as the results of the FT-IR analysis can only be seen as an indication of chemotype characterization [39, 40]. After these first analyses, FT-IR spectroscopy seems to be too time consuming with inconsistent results for the characterization of *S. chartarum* chemotypes in practical terms. In conclusion, the differentiation of the

S. chartarum chemotypes via FT-IR spectroscopy can be achieved if the isolates are incubated for 7 days on MEA. It is not advisable to prolong the incubation period to increase reliability. For FT-IR spectroscopic measurements, the distinction of *S. chartarum* into an atranone- and a satratoxin-type remains the adequate differentiation.

Acknowledgements

This project was funded by the Brigitte and Wolfram-Gedek-Foundation, Ismaning, Germany. The authors' thanks for their skilful laboratory assistance are due to Mrs. Barbara Fritz, Mrs. Verena Hohenester and Mr. Sebastian Schlef. The statistical data analysis by Mr. Sven Reese has been highly appreciated.

References

1. Wang Y, Hyde KD, McKenzie EH, Jiang Y-L, Li D-W, Zhao D-G. Overview of *Stachybotrys* (*Memnoniella*) and current species status. *Fungal Divers.* 2015;71(1):17-83.
2. Lombard L, Houbraken J, Decock C, Samson R, Meijer M, Réblová M et al. Generic hyperdiversity in Stachybotriaceae. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi.* 2016;36:156.
3. McQuade AB. Morphogenesis and nutrition in the *Memnionella-Stachybotrys* group of fungi. *J Gen Microbiol.* 1963;30:429-35.
4. Nikulin M, Pasanen A-L, Berg S, Hintikka E-L. *Stachybotrys atra* Growth and Toxin Production in Some Building Materials and Fodder under Different Relative Humidities. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60(9).
5. Bloom E, Bal K, Nyman E, Larsson L. Optimizing a GC-MS method for screening of *Stachybotrys* mycotoxins in indoor environments. *J Environ Monit: JEM.* 2007;9(2):151-6. doi:10.1039/b613853e.
6. Khatoon S, Jain S, Charaya M. Isolation and characterization of various fungal strains as primary coloniser from wheat straw at varying nitrogen concentrations. *Journal of Plant Development Sciences Vol.* 2017;9(10):925-31.
7. Biermaier B, Gottschalk C, Schwaiger K, Gareis M. Occurrence of *Stachybotrys chartarum* chemotype S in dried culinary herbs. *Mycotoxin Res.* 2015;31(1):23-32.
8. Gottschalk C, Bauer J, Meyer K. Determination of macrocyclic trichothecenes in mouldy indoor materials by LC-MS/MS. *Mycotoxin Res.* 2006;22(3):189-92. doi:10.1007/BF02959275.
9. Forgacs J. Stachybotryotoxicosis. In: Kadis A, L. AJ, Ciegler, editors. *Fungal Toxins.* New York, United States of America: Academic Press; 1972. p. 95 - 128.
10. Johanning E, Gareis M, Yang CS, Hintikka EL, Nikulin M, Jarvis BB et al. Toxicity screening of materials from buildings with fungal indoor air quality problems (*Stachybotrys chartarum*). *Mycotoxin Res.* 1998;14(2):60-73. doi:10.1007/BF02945095.
11. Andersen B, Nielsen KF, Thrane U, Szaro T, Taylor JW, Jarvis BB. Molecular and phenotypic descriptions of *Stachybotrys chlorohalonata* sp. nov. and two chemotypes of *Stachybotrys chartarum* found in water-damaged buildings. *Mycologia.* 2003;95(6):1227-58.
12. Jarvis BB. *Stachybotrys chartarum*: a fungus for our time. *Phytochemistry.* 2003;64(1):53-60. doi:10.1016/S0031-9422(03)00275-9.

13. Dearborn DG, Yike I, Sorenson WG, Miller MJ, Etzel RA. Overview of investigations into pulmonary hemorrhage among infants in Cleveland, Ohio. *Environ Health Perspect.* 1999;107:495-9.
14. Dearborn DG, Smith PG, Dahms BB, Allan TM, Sorenson WG, Montana E et al. Clinical profile of 30 infants with acute pulmonary hemorrhage in Cleveland. *Pediatrics.* 2002;110(3):627-37. doi:10.1542/peds.110.3.627.
15. Etzel R, Montana E, Sorenson WG, Kullman G, Miller JD, Jarvis B et al. Pulmonary Hemosiderosis Associated With Exposure to *Stachybotrys Atra*: T 78. *Epidemiology.* 1996;7(4):S38.
16. Etzel RA, Montana E, Sorenson WG, Kullman GJ, Allan TM, Dearborn DG et al. Acute pulmonary hemorrhage in infants associated with exposure to *Stachybotrys atra* and other fungi. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 1998;152(8):757-62. doi:10.1001/archpedi.152.8.757.
17. Mussalo-Rauhamaa H, Nikulin M, Koukila-Kähkölä P, Hintikka E-L, Malmberg M, Haahtela T. Health Effects of Residents Exposed to *Stachybotrys* in Water-damaged Houses in Finland. *Indoor Built Environ.* 2010.
18. Johanning E, Biagini R, Hull D, Morey P, Jarvis B, Landsbergis P. Health and immunology study following exposure to toxigenic fungi (*Stachybotrys chartarum*) in a water-damaged office environment. *Int Arch Occup Environ Health.* 1996;68(4):207-18. doi:10.1007/bf00381430.
19. Ulrich S, Niessen L, Ekruth J, Schäfer C, Kaltner F, Gottschalk C. Truncated satratoxin gene clusters in selected isolates of the atranone chemotype of *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb.) S. Hughes. *Mycotoxin Res.* 2019;1-9.
20. Dinkelacker AG, Vogt S, Oberhettinger P, Mauder N, Rau J, Kostrzewa M et al. Typing and species identification of clinical *Klebsiella* isolates by Fourier transform infrared spectroscopy and matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2018;56(11):e00843-18.
21. Curk M, Peledan F, Hubert J. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identifying *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol Lett.* 1994;123(3):241-8.
22. Taha M, Hassan M, Essa S, Tartor Y. Use of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) spectroscopy for rapid and accurate identification of yeasts isolated from human and animals. *Int J Vet Sci Med.* 2013;1(1):15-20.
23. Lecellier A, Mounier J, Gaydou V, Castrec L, Barbier G, Ablain W et al. Differentiation and identification of filamentous fungi by high-throughput FTIR spectroscopic analysis of mycelia. *Int J Food Microbiol.* 2014;168:32-41.
24. Lecellier A, Gaydou V, Mounier J, Hermet A, Castrec L, Barbier G et al. Implementation of an FTIR spectral library of 486 filamentous fungi strains for rapid identification of molds. *Food Microbiol.* 2015;45:126-34.
25. Shapaval V, Møretrø T, Suso HP, Åsli AW, Schmitt J, Lillehaug D et al. A high-throughput microcultivation protocol for FTIR spectroscopic characterization and identification of fungi. *J Biophotonics.* 2010;3(8-9):512-21.
26. Shapaval V, Schmitt J, Møretrø T, Suso H, Skaar I, Åsli A et al. Characterization of food spoilage fungi by FTIR spectroscopy. *J Appl Microbiol.* 2013;114(3):788-96.
27. Burgula Y, Khali D, Kim S, Krishnan S, Cousin M, Gore J et al. Review of Mid-infrared fourier transform-infrared spectroscopy applications for bacterial detection. *J Rapid Methods Autom Microbiol.* 2007;15(2):146-75.
28. Biotyper IR. User manual. Doc. No. 5022573 ed. Bruker Daltonik GmbH, Bremen; 2017.
29. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977:159-74.
30. Cohen J. Kappa: Coefficient of concordance. *Educ Psych Measurement.* 1960;20(37).
31. Dahlberg KR, Etten J. Physiology and biochemistry of fungal sporulation. *Annu Rev Phytopathol.* 1982;20(1):281-301.
32. Jagels A, Lindemann V, Ulrich S, Gottschalk C, Cramer B, Hübner F et al. Exploring Secondary Metabolite Profiles of *Stachybotrys* spp. by LC-MS/MS. *Toxins.* 2019;11(3):133.

33. Bisby GR. *Stachybotrys*. Mycol Res. 1943;26(3-4):133-43. doi:10.1016/s0007-1536(43)80018-8.
34. Kaya-Celiker H, Mallikarjunan PK, Kaaya A. Characterization of invasion of genus *Aspergillus* on peanut seeds using FTIR-PAS. Food Anal Methods. 2016;9(1):105-13.
35. Frazer S, Magan N, Aldred D. The influence of water activity and temperature on germination, growth and sporulation of *Stachybotrys chartarum* strains. Mycopathologia. 2011;172(1):17-23. doi:10.1007/s11046-011-9394-x.
36. Fischer G, Braun S, Thissen R, Dott W. FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. J Microbiol Methods. 2006;64(1):63-77.
37. Gareis M, editor. Cytotoxicity testing of samples originating from problem buildings. Fungi and Bacteria in Indoor Air Environments; 1994; Saratoga Springs, New York: Eastern New York Occupational Health Program.
38. Johanning E, Gareis M, Nielsen K, Dietrich R, Märtlbauer E. Airborne mycotoxin sampling and screening analysis. Indoor air. 2002:1-6.
39. Gottschalk C, Bauer J, Meyer K. Detection of satratoxin g and h in indoor air from a water-damaged building. Mycopathologia. 2008;166(2):103-7. doi:10.1007/s11046-008-9126-z.
40. Hanelt M, Gareis M, Kollarczik B. Cytotoxicity of mycotoxins evaluated by the MTT-cell culture assay. Mycopathologia. 1994;128(3):167-74. doi:10.1007/BF01138479.

Tables and figure legends

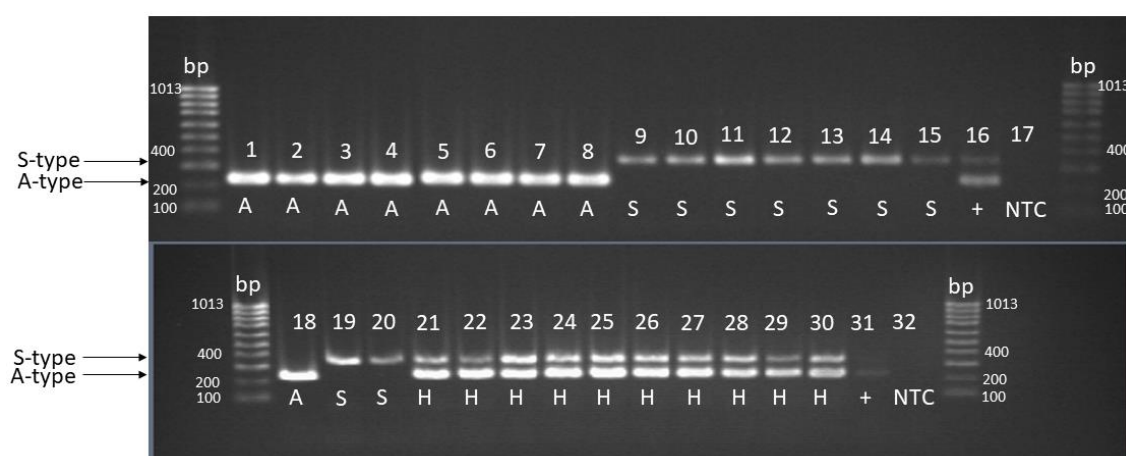
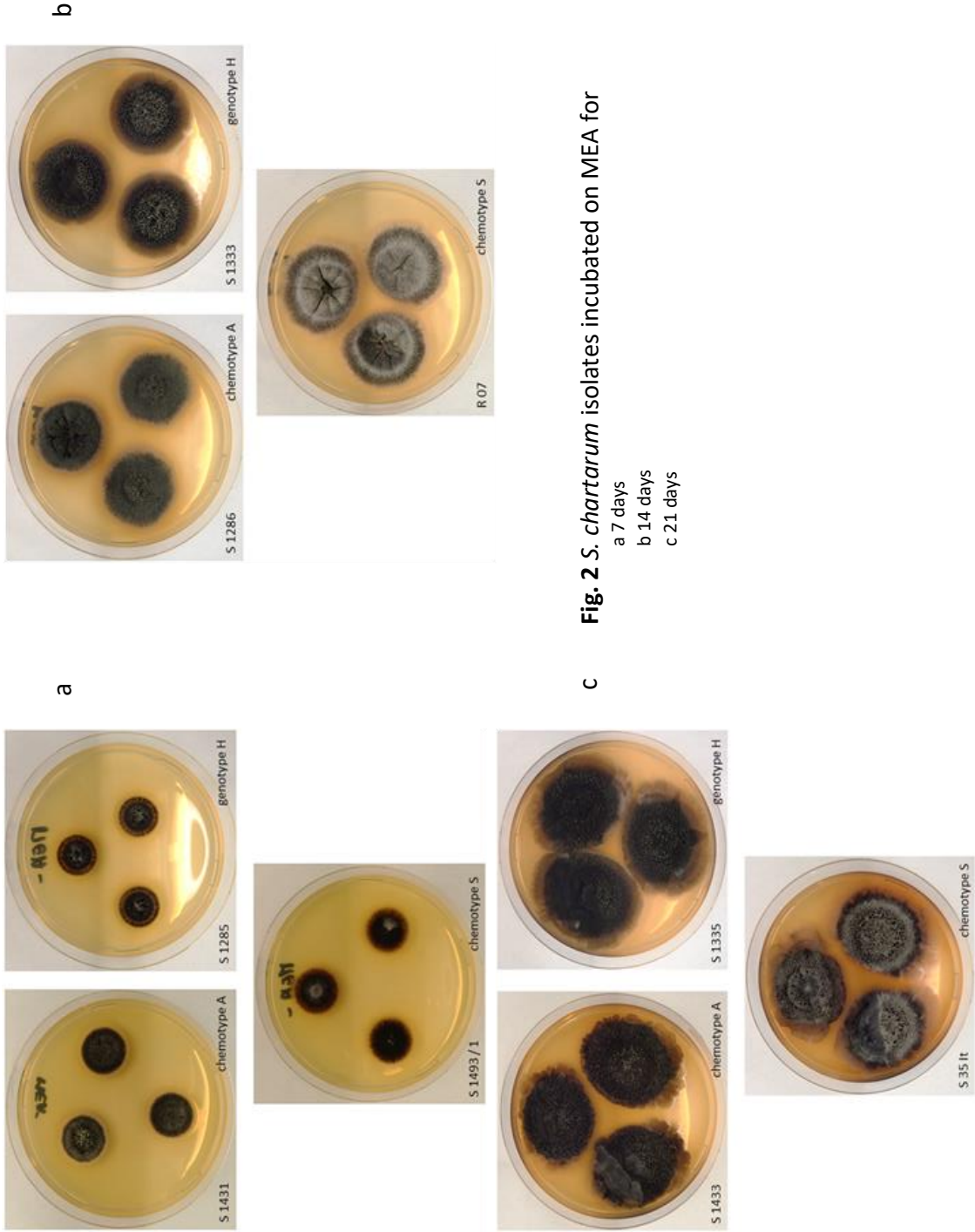


Fig. 1 Agarose gel (1.5 %) stained with Ethidium bromide (0.5 µg/mL) for visualization of the results of triplex PCR for the identification of atranone (chemotype A: 230 bp)- and satratoxin (chemotype S: 346 bp)-gene clusters in *S. chartarum*; in genotype H isolates both clusters are detectable:

1 = S 1074, 2 = S 1244, 3 = S 1286, 4 = S 1353, 5 = S 1378, 6 = S 1431, 7 = S 1432, 8 = S 1433, 9 = S 1114, 10 = S 1493/1, 11 = S 35 It, 12 = R 07, 13 = R 24, 14 = S BO1a, 15 = S BO1b, 16 = positive control^a, 17 = non template control, 18 = S 1362, 19 = S BO2, 20 = S BB2, 21 = S 1077, 22 = S 1285, 23 = S 1333, 24 = S 1334, 25 = S 1335, 26 = S 1341, 27 = S 29, 28 = S 41, 29 = S 42, 30 = S 43, 31 = positive control^a, 32 = non template control

a = IBT 40293, IBT 7711 and IBT 4028



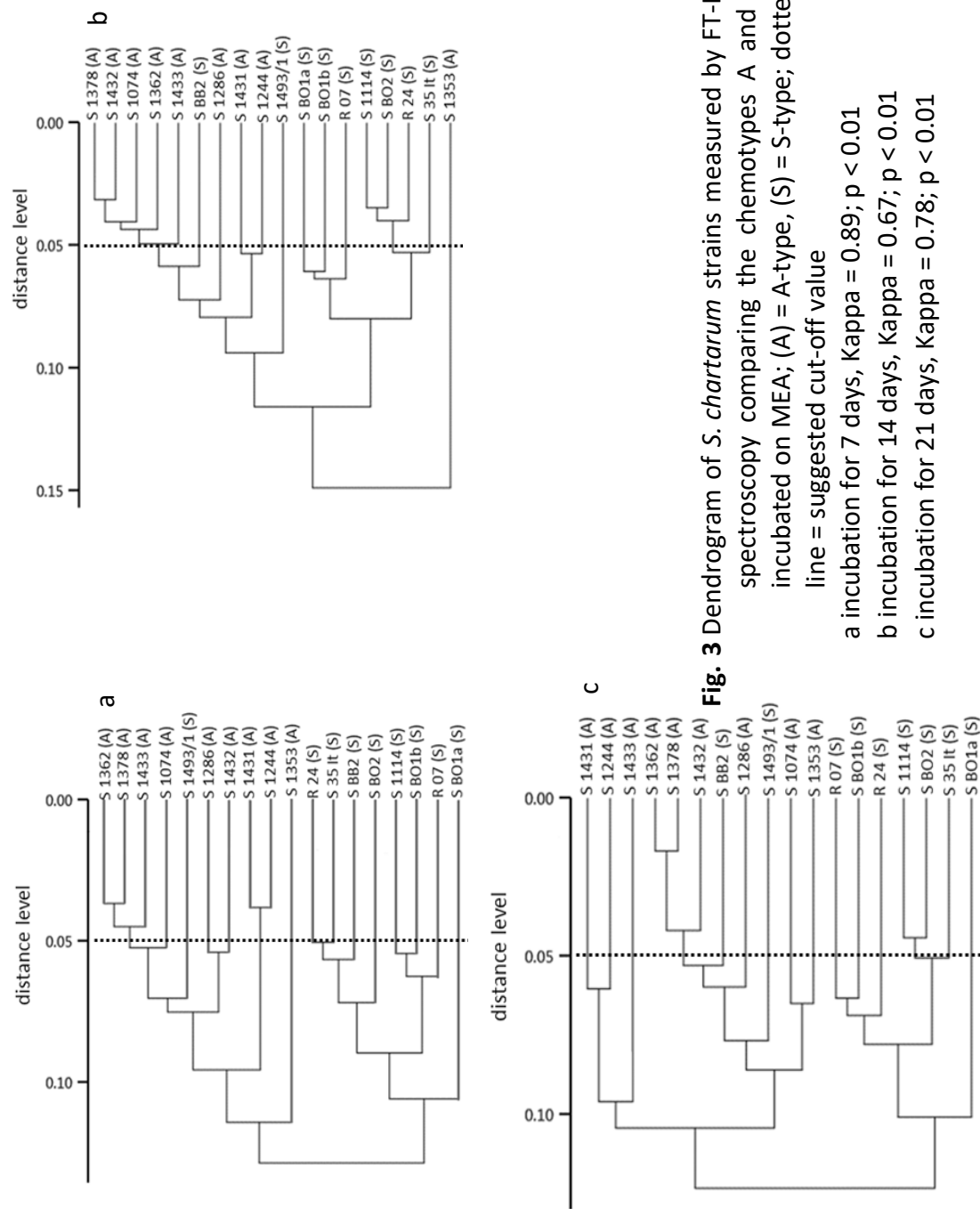


Fig. 3 Dendrogram of *S. chartarum* strains measured by FT-IR spectroscopy comparing the chemotypes A and S incubated on MEA; (A) = A-type, (S) = S-type; dotted line = suggested cut-off value

a incubation for 7 days, Kappa = 0.89; $p < 0.01$
b incubation for 14 days, Kappa = 0.67; $p < 0.01$
c incubation for 21 days, Kappa = 0.78; $p < 0.01$

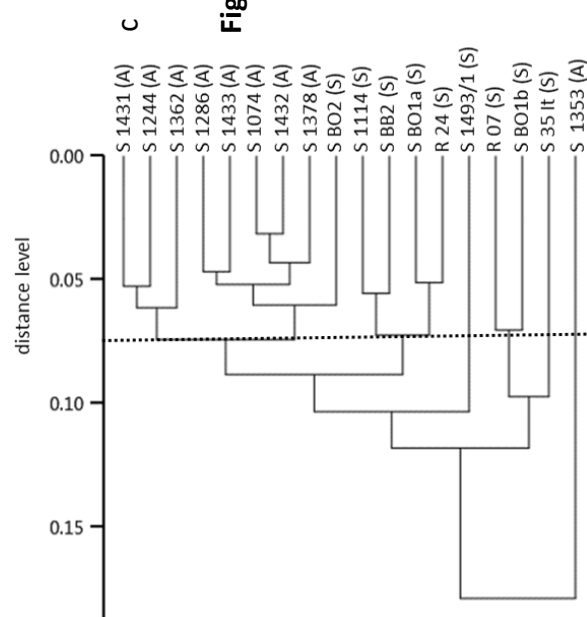
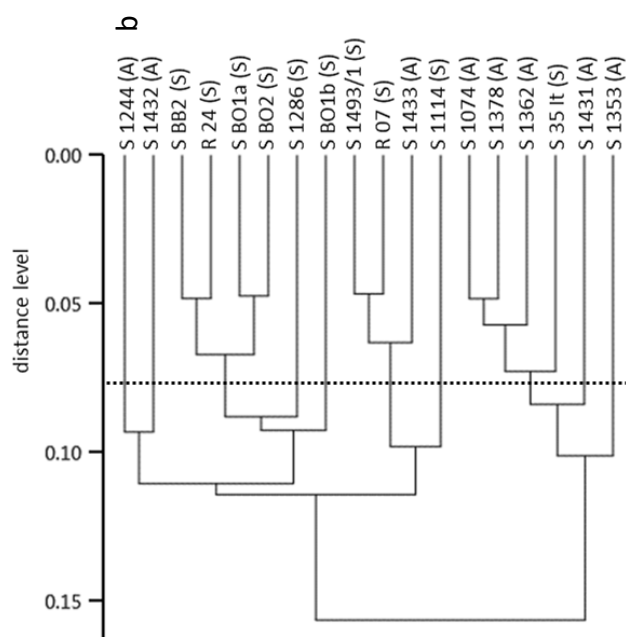
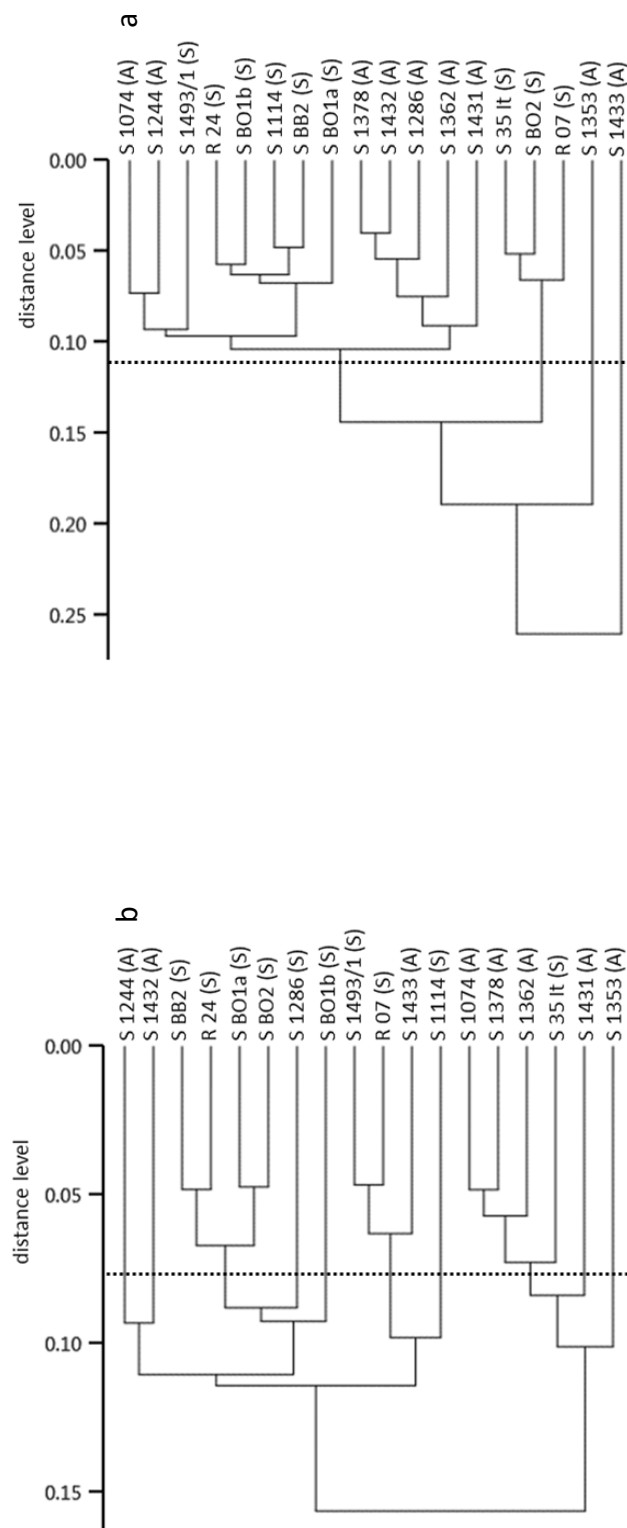


Fig. 4 Dendrograms of *S. chartarum* strains measured by FT-IR spectroscopy comparing the chemotypes A and S incubated on PDA; (A) = A-type, (S) = S-type; dotted line = suggested cut-off value

a incubation for 7 days, Kappa = 0.44; $p = 0.05$

b incubation for 14 days, Kappa = 0.11; $P > 0.5$

c incubation for 21 days, Kappa = 0.22; $p < 0.5$

Table 1 Strains and characteristics of *Stachybotrys (S.) chartarum* ($n = 28$, in-house culture collection and reference strains) examined in the present study

ID	Source	Isolated from	Triplex PCR-typing ^b	Macrocyclic trichothecenes ^c
S 1074	FSM	wallpaper	A	-
S 1244	FSM	gypsum board	A	-
S 1286	FSM	gypsum board	A	-
S 1353	FSM	wallpaper	A	-
S 1362	FSM	wallpaper	A	-
S 1378	FSM	wallpaper	A	-
S 1431	FSM	plasterboard	A	-
S 1432	FSM	plasterboard	A	-
S 1433	FSM	plasterboard	A	-
IBT 40288 ^d	IBT	building material	A	-
R 07 ^{a,d}	IBT (IBT 40293)	building material	S	+
R 24 ^a	ATCC (ATCC 34916)	oats	S	+
S 1114 ^a	MRI (R 03)	plasterboard	S	+
S 1493/1	FSM	air sample	S	+
S 35 lt	FSM	straw	S	+
S BB2	FSM	savory	S	+
S BO1a	FSM	oregano	S	+
S BO1b	FSM	oregano	S	+
S BO2	FSM	oregano	S	+
IBT 7711 ^d	IBT	building material	S	+
S 1077	FSM	plasterboard	H	-
S 1285	FSM	gypsum board	H	-
S 1333	FSM	gypsum board	H	-
S 1334	FSM	gypsum board	H	-
S 1335	FSM	gypsum board	H	-
S 1341	FSM	wallpaper	H	-
S 29	FSM	straw	H	-
S 41	FSM	unknown	H	-
S 42 ^a	IBT (HMRB 10)	unknown	H	-
S 43 ^a	CBS (CBS 324.65)	textile	H	-

CBS Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands; FSM Chair of Food Safety Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany; IBT Culture Collection of Fungi, Danish Technical University, Lyngby, Denmark; ATCC American Type Culture Collection, Manassas, USA, MRI Max Rubner Institut, Kulmbach, Germany

^areference strains

^bmethod according to Ulrich et al. (2019) [19]

^cprior analyses (Gareis M. Characterization of *Stachybotrys chartarum* strains of the in-house culture collection in terms of toxin production by LC-MS/MS. Personal Communication; 2020.)

^dused as positive control for PCR identification

Table 2 Kappa- and p-values for *S. chartarum* strains measured by FT-IR spectroscopy comparing genotype H to the chemotypes S and A

medium	Genotype H vs. Chemotype S						Genotype H vs. Chemotype A					
	MEA			PDA			MEA			PDA		
incubation period (days)	7	14	21	7	14	21	7	14	21	7	14	21
Kappa	0.35	0.68	0.57	0.27	0.24	0.57	0.24	0.37	0.43	0.08	< 0	0.09
<i>p</i>	> 0.05	< 0.01	< 0.05	> 0.05	> 0.05	< 0.01	> 0.05	> 0.05	0.05	> 0.05	< 0.01	> 0.05

MEA = malt extract agar, PDA = potato dextrose agar

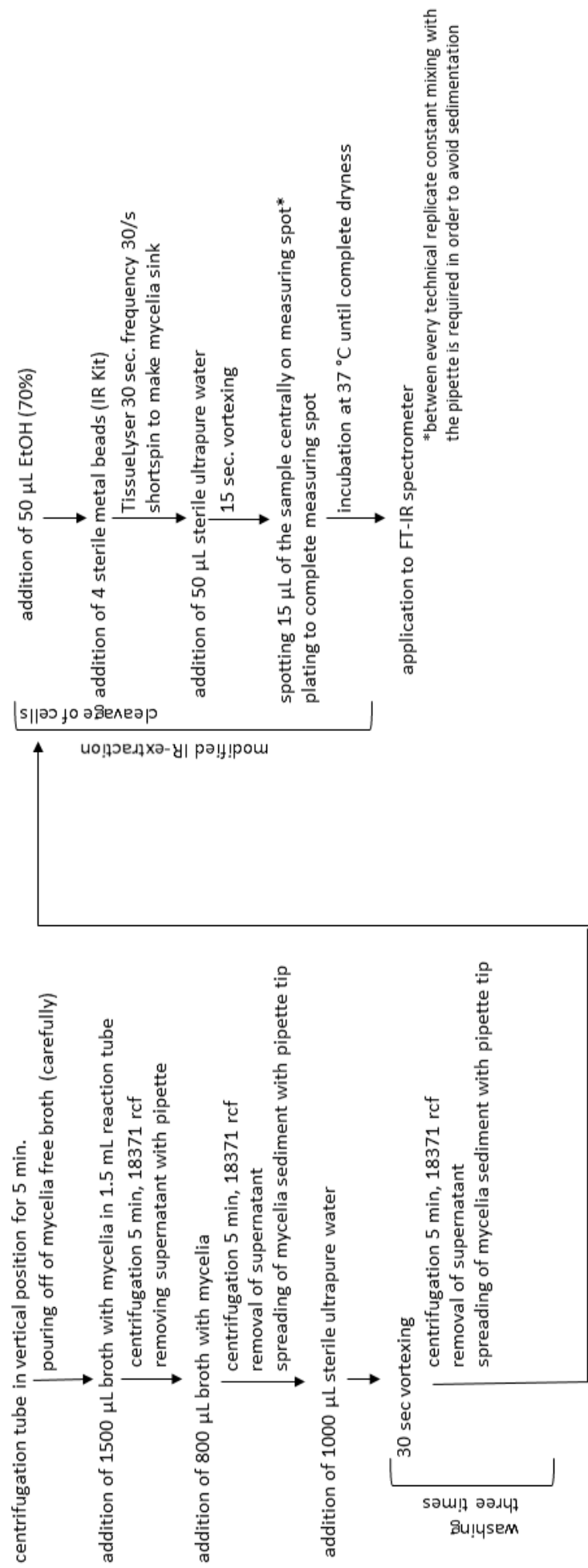


Figure S1: Workflow for the preparation of *S. chartarum* isolates for application to FT-IR measurements

4 Diskussion

Das Ziel dieser Studie war es, eine für *S. chartarum* angepasste Probenaufbereitung für die Analyse mittels FT-IR Spektroskopie anzuwenden, um die Chemotypen A und S zu unterscheiden. Zudem sollte überprüft werden, ob der kürzlich mittels Triplex-PCR (Ulrich et al., 2019) neu beschriebene Hybrid-Genotyp von *S. chartarum* ebenfalls mit dieser Methode differenziert werden kann.

Die für die Studie ausgewählten Isolate von *S. chartarum* (n = 28) wurden aus der hauseigenen Stammsammlung ausgewählt, deren Zuordnung zu einem der beiden Chemotypen bereits anhand des tri5-Genabschnittes durchgeführt worden ist (Andersen et al., 2003). Anschließend wurde die in einer vorhergehenden Arbeit entwickelte Triplex-PCR zur Identifizierung der Genotypen anhand der Atranon- und Satratoxin-Gencluster angewandt, wobei für jedes Isolat mindestens ein Gencluster nachgewiesen werden konnte (Ulrich et al., 2019).

Nach der Charakterisierung als Chemotyp bzw. Genotyp mittels PCR wurden die Isolate für 7, 14 und 21 Tage auf MEA und PDA inkubiert und anschließend in das entsprechende Flüssigmedium überführt (Ekruth et al., 2020).

Für die Untersuchung von Schimmelpilzen mittels FT-IR Spektroskopie gibt es kein universal anwendbares Protokoll (s. Tabelle 7). Daher wurde ein geeignetes Protokoll für die Probenaufbereitung anhand von Mycel aus einem Flüssigmedium für die Anwendung auf *S. chartarum* optimiert und angewandt (Ekruth et al., 2020; Shapaval et al., 2010).

Die FT-IR Spektroskopie wird für die Differenzierung von Bakterien und Hefen eingesetzt, da die Isolate bereits nach 24 Stunden Inkubationszeit untersucht werden können und die Probenaufbereitung sowie die Messung in kurzer Zeit durchzuführen sind (Naumann, 1985; Naumann et al., 1988).

Es werden nur wenige Chemikalien benötigt und aufgrund der kurzen Messdauer kann ein hoher Probendurchsatz erreicht werden. Da sich diese Technik als einfach durchführbar herausgestellt hat, ist sie für die Identifizierung und Charakterisierung von Bakterien und Hefen etabliert (Giesbrecht et al., 1985; Naumann, 1985).

Zur Identifizierung und Charakterisierung von *Mycota* sind aufwändige Labormethoden und ausgebildetes Personal notwendig, da die Phänotypisierung dafür nicht ausreichend ist. Daher wird die FT-IR Spektroskopie auch für diese Mikroorganismen als geeignete Identifizierungsmethode angesehen (Fischer et al., 2006; Fischer und Dott, 2002).

Bisher konnte die FT-IR Spektroskopie erfolgreich für die Identifizierung und Charakterisierung von verschiedenen Schimmelpilzen eingesetzt werden (s. Tabelle 7). Je nach technischer Ausstattung und Untersuchungsziel sind unterschiedliche Methoden für die Analyse von *Mycota* entwickelt worden. In keiner dieser Studien wurde *S. chartarum* untersucht.

Die Methode von Shapaval et al. (2010), bei der das Mycel aus einem Flüssigmedium mit anschließender Homogenisierung von verschiedenen Schimmelpilzen erfolgreich zur Identifizierung und Charakterisierung herangezogen werden konnte, wurde als Grundlage für diese Arbeit ausgewählt.

Bei der Probenaufbereitung verhalten sich die Konidien und Sporen hydrophob und konzentrieren sich nach dem Auftragen auf die Messplatte in der Mitte des Messpunktes. Die Messung mittels FT-IR Spektroskopie ist nicht möglich, wenn dieses Phänomen nicht durch die Zugabe von 70%-igem Ethanol verhindert wird (Fischer et al., 2006).

Die Beeinträchtigung der Messungen durch dunkles Pigment, das bei der Inkubation auf Festnährmedien entsteht, wird durch die anschließende Inkubation in einem entsprechenden Flüssignährmedium vermieden. Die Anzucht der *S. chartarum*-Stämme auf den Festnährmedien MEA und PDA führte stets zur Bildung von gräulich-schwarzem Pigment. Beim Wachstum in flüssigen Nährmedien produzieren filamentöse Pilze deutlich weniger bzw. gar keine Sporen, dadurch ist auch die Bildung von dunklem Pigment reduziert (Dahlberg und Etten, 1982; Ulrich, 2016).

Zum Aufschließen der bei Schimmelpilzen stärker ausgeprägten Zellwände muss bei der Aufbereitung für die FT-IR Analyse eine Homogenisierung des Probenmaterials durchgeführt werden. Dies kann durch Ultraschallwellen, Glasperlen oder auch mit Metallzylindern erreicht werden, wobei sich die Kombination von Metallzylindern aus der Probenaufbereitung für Bakterien und Hefen mit dem TissueLyser® als geeignet für *S. chartarum* herausgestellt hat (Carlile et al., 2001; Ekruth et al., 2020; Haag et al.,

1996; N.N., 2017).

Damit Reste des Flüssignährmediums die Messungen nicht beeinträchtigen, wird das entnommene Mycel dreimal mit sterilem Reinstwasser gewaschen. Diese Vorgehensweise stellte sich schon bei Shapaval et al. (2010) als vorteilhaft heraus.

Andere Protokolle zur Probenaufbereitung von Schimmelpilzen für die FT-IR Analyse sind nicht uneingeschränkt auf *S. chartarum* anwendbar (s. Tabelle 7).

Für die Analyse von *S. chartarum* wurde die Probenaufbereitung von Shapaval et al. (2010) ausgewählt und modifiziert. Die in der vorliegenden Studie untersuchten Stämme wurden ebenfalls in Flüssigmedium inkubiert und ein Homogenisierungsschritt ergänzt.

Allerdings mussten die Stämme von *S. chartarum* zuvor länger auf Festmedien inkubiert werden, um eine ausreichende Versporung vor dem Überimpfen in Flüssigmedien zu gewährleisten. Dies neutralisiert die in anderen Studien positiv hervorgehobene Zeitersparnis der FT-IR Spektroskopie gegenüber klassischer Identifizierungs- und Charakterisierungsmethoden der Mykologie.

Für die Anzucht der ausgewählten *S. chartarum*-Isolate wurden die Nährmedien MEA und PDA ausgewählt, da diese als Standardnährmedien gelten (Andersen et al., 2003; Magan et al., 2012; Samson, 2010).

Nicht alle Isolate versporteten sich gleichermaßen intensiv auf PDA wie auf MEA. PDA stellte sich als nicht geeignet für die Inkubation vor der FT-IR Analyse heraus, was sich bereits bei anderen Methoden zeigte (Ekruth et al., 2020; Magan et al., 2012; Samson, 2010; Ulrich, 2016). Daher ist MEA als Nährmedium für die FT-IR Analyse von *S. chartarum* zu bevorzugen. Ein Überangebot an Nährstoffen oder ein Mangel an Licht können dazu führen, dass nur vegetatives Mycel gebildet wird (Mooney und Yager, 1990; Skromne et al., 1995). Ein Mangel an Nährstoffen ist jedoch kein Garant für die Versporung bei Schimmelpilzen (Adams et al., 1998).

Durch wiederholte Subkultivierungen können sich das makroskopische Erscheinungsbild und das Metabolitenprofil von *S. chartarum* verändern (Andersen et al., 2002; Andersen et al., 2003; Bisby, 1943).

Um die Einflüsse der Subkultivierungen auf die Analyseergebnisse zu reduzieren, wurden alle Isolate von Urkulturen für die biologischen Replikate angezüchtet und standardisierte Inkubationsbedingungen durch einen Klimabrutschrank gewährleistet.

Für einen möglichst hohen Grad an Reinheit wurden die Urkulturen nach Wiederanzucht aus Lyophilisaten bzw. Vorräten in Glycerin als Einsporisolationen angelegt (Niessen, 2018).

Die korrekte Auftrennung der Chemotypen A und S konnte nach 7 Tagen auf MEA erreicht werden ($\text{Kappa} = 0,89$; $p < 0,01$).

Um zu bestimmen, inwieweit die Charakterisierungsergebnisse von PCR und FT-IR-Messungen übereinstimmen, wurden die Cohen's Kappa-Werte berechnet und die Kongruenz der Analyseergebnisse anhand der zugewiesenen Kategorien (s. Tabelle 8) bewertet (Cohen, 1960; Landis und Koch, 1977).

Für die Untersuchungen nach Inkubation auf MEA schwanken die errechneten Kappa-Werte zwischen 0,89 und 0,24; für die Inkubation auf PDA zwischen < 0 und 0,57. Somit kann eine verlässliche Unterscheidung der beiden Chemotypen nur nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen auf MEA erreicht werden.

Die Differenzierung der drei Genotypen konnte in keiner der durchgeführten Untersuchungen nachgewiesen werden (s. Table 2, S. 50).

Tabelle 8: Zuordnung der Kappa-Werte zu den Kategorien der Übereinstimmungsgrade nach Landis und Koch (1977)

Cohen's Kappa-Wert	Kategorisierung der Übereinstimmung
0,81-1	(fast) vollständig
0,61-0,8	beachtlich
0,41-0,6	moderat
0,21-0,4	ausreichend
0-0,2	gering

Bisher ist nur eine weitere Studie zu Untersuchungen bekannt, bei der die FT-IR Spektroskopie zur Unterscheidung von toxinbildenden und nicht-toxinbildenden Schimmelpilzstämmen genutzt wurde (Kaya-Celiker et al., 2016). Aufgrund der unterschiedlichen apparativen Ausstattung war die Probenaufbereitung nicht für die Anwendung auf *S. chartarum* geeignet. Bei der Analyse von *S. chartarum* wurde die Differenzierung anhand des Toxinbildungsvermögens in Bezug auf makrozyklische

Trichothecene angestrebt. Da die Menge der gebildeten Toxine im zeitlichen Verlauf zunimmt und ihr Maximum nach 21 Tagen erreicht, wurden die Messpunkte nach 7, 14 und 21 Tagen Inkubation auf Festmedien ausgewählt (Höhne, 2008; Jagels et al., 2019).

Die Auswertung der Dendrogramme hat ergeben, dass die korrekte Zuordnung der Chemo- bzw. Genotypen in zwei einwandfrei aufgetrennte Cluster im Verlauf der Zeit abnimmt (Ekruth et al., 2020).

Ebenso wie bei der Bildung von toxischen Sekundärmetaboliten nehmen die zur Differenzierung relevanten Strukturen wie Proteine und Kohlenhydrate während des Wachstums zu, aber nach 5 Tagen bei anderen Spezies wieder ab (Augustyn et al., 1990; Gottlieb und Van Etten, 1964; Höhne, 2008; Jagels et al., 2019; Suskind und Bonner, 1960).

Da die Chemotypen A und S von *S. chartarum* nur nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen auf MEA unterschieden werden können, scheinen die für die Differenzierung relevanten molekularen Verbindungen auch bei *S. chartarum* nach wenigen Tagen wieder abzunehmen. Die Unterscheidung von drei Genotypen bei *S. chartarum* konnte anhand der FT-IR Analysen nicht bestätigt werden. Dies könnte daran liegen, dass die hier zur Unterscheidung relevanten Oberflächenstrukturen wie Polysaccharide oder Chitin des Mycels auf dem Genotyp H keine mit dieser Technik differenzierbaren Abweichungen aufweisen.

Im Rahmen der hier durchgeführten Studie konnten *S. chartarum*-Isolate so aufbereitet werden, dass sie via FT-IR Spektroskopie untersucht werden konnten. Die erfolgreiche Differenzierung der Chemotypen A und S von *S. chartarum* ist anhand dieser Technik möglich, sofern die Isolate für 7 Tage auf MEA inkubiert worden sind.

Für eine verlässliche Aussage über die Toxigenität und das potenzielle Gesundheitsrisiko ist die Charakterisierung eines *S. chartarum*-Isolates als Chemotyp S nicht ausreichend.

Entscheidend ist die Art der Exposition (orale Aufnahme, Inhalation und direkter Kontakt) und auch die Menge der gebildeten Toxine (Gareis, 1994; Johanning et al., 2002).

Die Toxinbildung ist mittels LC-MS/MS oder ELISA als Suchtest für makrozyklische Trichothecene nachzuweisen (Gottschalk et al., 2008; Martlbauer et al., 1988).

Für die Bestätigung der Zytotoxizität bei Vorhandensein von makrozyklischen Trichothecenen bleibt der MTT-Zellkulturtest uneingeschränkt relevant (Hanelt et al., 1994).

Da die Chemotypen A und S nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen auf MEA unterschieden werden konnten, kann die FT-IR Spektroskopie als geeignete Erweiterung des Methodenspektrums für die Identifizierung und Charakterisierung von *S. chartarum*-Isolaten angesehen werden, ist aber aufgrund der eingeschränkten Verlässlichkeit und des hohen apparativen und zeitlichen Aufwandes in der Praxis schwierig einzusetzen.

5 Zusammenfassung

Der Schimmelpilz *Stachybotrys (S.) chartarum* kommt ubiquitär auf feuchten und zellulosereichen Materialien wie Baumaterialien (Tapete, Rigips) und Futtermitteln (Heu, Stroh) vor. Da *Stachybotrys* spp. hohe a_w -Werte zum Wachstum benötigen, kommen diese regelmäßig in feuchtigkeitsgeschädigten Innenräumen vor.

S. chartarum kann anhand phylogenetischer Kriterien und des Metabolitenprofils in die Chemotypen A und S unterteilt werden. Die Isolate des Chemotyps A produzieren Atranone, während jene des Chemotyps S die hochgradig zytotoxischen makrozyklischen Trichothecene bilden können. Diese stellen ein Gefährdungspotential für Mensch und Tier dar, da sie als Auslöser der bei Pferden oft tödlich verlaufenden Stachybotryotoxikose bekannt sind und vermutlich an der Entstehung des Sick Building Syndroms beteiligt sind.

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, inwiefern die Chemotypen S und A mittels FT-IR-Spektroskopie verlässlich differenziert werden können. Zuerst wurden alle Isolate (n= 28) mittels Triplex-PCR anhand der Atranon- und Satratoxin-Gencluster identifiziert und charakterisiert. Für die Analyse mittels FT-IR Spektroskopie wurden die Stämme für drei unterschiedliche lange Inkubationszeiten (7, 14, 21 Tage) auf Festnährmedien bebrütet und anschließend in ein Flüssigmedium überimpft. Zur Optimierung der Probenaufbereitung wurde zudem ein Homogenisierungsschritt ergänzt. Der Grad der Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen aus der molekularbiologischen Charakterisierung und der FT-IR-Spektroskopie wurde anhand der kategorisierten Cohen's Kappa-Werte (s. Tabelle 8) beurteilt.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Differenzierung von Chemotyp A und S bei Inkubation auf Malzextrakt-Agar nach 7 Tagen möglich ist (Kappa = 0,89; $p < 0,01$). Eine Verlängerung der Inkubationszeit oder eine Anzucht auf Potato-Dextrose-Agar führten zu weniger Übereinstimmungen in den Charakterisierungsergebnissen. Die mittels Triplex-PCR nachweisbaren Genotypen konnten mit der FT-IR Spektroskopie nicht dargestellt werden.

In dieser Studie konnte zum ersten Mal demonstriert werden, dass die FT-IR Spektroskopie auch auf Isolate von *S. chartarum* angewandt werden kann. Diese Methode stellt jedoch aufgrund der geringen Verlässlichkeit und des hohen

apparativen und zeitlichen Aufwands keine praktikable Methode zur Beurteilung des Gefährdungspotentials von *S. chartarum* dar.

6 Summary

Stachybotrys (S.) chartarum is a ubiquitous mould. Due to its cellulolytic activity, it can mostly be found on building materials (e.g., wallpaper, gypsum board) and feed (hay, straw) rich in cellulose. As strains of *S. chartarum* also require high a_w -values, they are commonly found in buildings after water damages.

Due to phylogenetic and metabolic criteria, *S. chartarum* can be divided into two chemotypes. The isolates of chemotype A produce atranones whereas the isolates of chemotype S can produce the highly cytotoxic macrocyclic trichothecenes. These secondary metabolites are known as the causative agents of the disease stachybotryotoxicosis often leading to death in horses. They are also suspected to be part of the symptom complex called Sick Building Syndrome.

The study at hand aimed at the evaluation to which extent the chemotypes A and S can be differentiated via FT-IR spectroscopy. Initially, all the isolates ($n = 28$) were characterized via Triplex-PCR by identifying the atranone- and satratoxin geneclusters. To analyse the strains via FT-IR spectroscopy, the isolates were incubated for 7, 14 and 21 days on solid medium and then transferred to a liquid medium. To optimize the sample preparation, a homogenization step was added. To assess the degree of accordance between the results of the PCR characterization and the FT-IR spectroscopic measurements, the Cohen's Kappa values were calculated and categorized.

The results revealed that after an incubation period on malt extract agar for 7 days the chemotypes A and S can be differentiated via this technique ($\text{Kappa} = 0.89$; $p < 0.01$). The prolongation of the incubation period and the usage of potato-dextrose-agar resulted in a less correct characterization. The three genotypes which were distinguishable via triplex-PCR could not be confirmed via FT-IR spectroscopy.

This study has proven for the first time that FT-IR spectroscopy can be successfully used for the analysis of *S. chartarum*. Due to the low reliability, high technical requirements and the time-consuming realization, this method cannot be considered as applicable for the hazard analysis of *S. chartarum* isolates.

7 Literaturverzeichnis

ABDEL-HAFEZ, S. I. & EL-SAID, A. H. (1997) Effect of garlic, onion and sodium benzoate on the mycoflora of pepper, cinnamon and rosemary in Egypt. *International Biodeterioration & Biodegradation* 39, 67-77

ABDEL-HAFEZ, S. & EL NAGGAR, S. (2006) Morphological, reproductive and mycobiota characters of three wild medicinal plants inhabiting Western Mediterranean coastal land, Egypt. *Feddes Repertorium: Zeitschrift für botanische Taxonomie und Geobotanik* 117, 240-249

ADAMS, T. H., WIESER, J. K. & YU, J.-H. (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and molecular biology reviews* 62, 35-54

ADITAMA, T. Y. & ANDARINI, S. L. (2002) Sick building syndrome. *Medical Journal of Indonesia* 11, 124-131

ANDERSEN, B., NIELSEN, K. F. & JARVIS, B. B. (2002) Characterization of *Stachybotrys* from water-damaged buildings based on morphology, growth, and metabolite production. *Mycologia* 94, 392-403

ANDERSEN, B., NIELSEN, K. F., THRANE, U., SZARO, T., TAYLOR, J. W. & JARVIS, B. B. (2003) Molecular and phenotypic descriptions of *Stachybotrys chlorohalonata* sp. nov. and two chemotypes of *Stachybotrys chartarum* found in water-damaged buildings. *Mycologia* 95, 1227-1258

ANDERSSON, M. A., NIKULIN, M., KOLJALG, U., ANDERSSON, M. C., RAINEY, F., REIJULA, K., HINTIKKA, E. L. & SALKINOJA-SALONEN, M. (1997) Bacteria, molds, and toxins in water-damaged building materials. *Appl Environ Microbiol* 63, 387-393

ASKALONOV, S. P. (1949) Pathogenicity of *Stachybotrys alternans* fungus for cattle and laboratory animals. A new fungal disease of horses and humans. *Stachybotryotoxicosis*, 37-47 nach Forgacs (1972)

AUGUSTYN, O., KOCK, J. & FERREIRA, D. (1990) Differentiation between yeast species, and strains within a species, by cellular fatty acid analysis. 3. *Saccharomyces sensu lato*, *Arxiozyma* and *Pachytichospora*. *Systematic and applied microbiology* 13, 44-55

AYERST, G. (1969) The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *Journal of Stored Products Research* 5, 127-141

BAO, Y.-R., CHEN, G.-D., WU, Y.-H., LI, X.-X., HU, D., LIU, X.-Z., LI, Y., YAO, X.-S. & GAO, H. (2015) Stachybisbins A and B, the first cases of seco-bisabosquols from *Stachybotrys bisbyi*. *Fitoterapia* 105, 151-155

BARS, J. L. & BARS, P. L. (1991) Toxinogenesis and development conditions of *Stachybothrys atra* in France. *Acta Veterinaria Scandinavica. Supplementum* (Denmark)

BARTHEL, J., GOTTSCHALK, C., RAPP, M., BERGER, M., BAUER, J. & MEYER, K. (2012) Occurrence of type A, B and D trichothecenes in barley and barley products from the Bavarian market. *Mycotoxin Res* 28, 97-106

BASTERT, J., KORTING, H., TRAENKLE, P. & SCHMALRECK, A. (1999) Identification of dermatophytes by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). *Mycoses* 42, 525-528

- BATA, A., HARRACH, B., UJSZÁSZI, K., KIS-TAMÁS, A. & LÁSZTITY, R. (1985) Macrocyclic Trichothecene toxins produced by *Stachybotrys atra* strains isolated in Middle Europe. Appl Environ Microbiol 49, 678-681
- BIERMAIER, B., GOTTSCHALK, C., SCHWAIGER, K. & GAREIS, M. (2015) Occurrence of *Stachybotrys chartarum* chemotype S in dried culinary herbs. Mycotoxin Res 31, 23-32
- BISBY, G. R. (1943) *Stachybotrys*. Transactions of the British Mycological Society 26, 133-143
- BLOOM, E., BAL, K., NYMAN, E., MUST, A. & LARSSON, L. (2007) Mass spectrometry-based strategy for direct detection and quantification of some mycotoxins produced by *Stachybotrys* and *Aspergillus* spp. in indoor environments. Appl Environ Microbiol 73, 4211-4217
- BOTHA, C. & NAUDÉ, T. (2002) Plant poisonings and mycotoxicoses of importance in horses in southern Africa. J S Afr Vet Assoc 73, 91-97
- BURGULA, Y., KHALI, D., KIM, S., KRISHNAN, S., COUSIN, M., GORE, J., REUHS, B. & MAUER, L. (2007) Review of Mid-infrared fourier transform-infrared spectroscopy applications for bacterial detection. Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology 15, 146-175
- BUSTON, H. W. & BASU, S. N. (1948) Some Factors Affecting the Growth and Sporulation of *Chaetomium globosum* and *Memnoniella echinata*
- CARLILE, M. J., WATKINSON, S. C. & GOODAY, G. W. (2001) The fungi, Gulf Professional Publishing
- COHEN, J. (1960) Kappa: Coefficient of concordance. Educ Psych Measurement 20
- COLE, R. J., JARVIS, B. B. & SCHWEIKERT, M. A. (2003) Handbook of secondary fungal metabolites. London, Academic Press
- COLTHUP, N. (2012) Introduction to infrared and Raman spectroscopy, Elsevier
- CORDA, A. C. J. (1837) Pilze und Schwaemme
- CRUSE, M., TELERANT, R., GALLAGHER, T., LEE, T. & TAYLOR, J. W. (2002) Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. Mycologia 94, 814-822
- CRUZ-PEREZ, P., BUTTNER, M. P. & STETZENBACH, L. D. (2001) Specific detection of *Stachybotrys chartarum* in pure culture using quantitative polymerase chain reaction. Mol Cell Probes 15, 129-138
- DAHLBERG, K. R. & ETTEN, J. (1982) Physiology and biochemistry of fungal sporulation. Annu Rev Phytopathol 20, 281-301
- DANKÓ, G. (1975) Stachybotryotoxicosis and Immunosuppression. International Journal of Environmental Studies 8, 209-211
- DEARBORN, D. G., SMITH, P. G., DAHMS, B. B., ALLAN, T. M., SORENSON, W. G., MONTANA, E. & ETZEL, R. A. (2002) Clinical profile of 30 infants with acute pulmonary hemorrhage in Cleveland. Pediatrics 110, 627-637
- DEARBORN, D. G., YIKE, I., SORENSON, W. G., MILLER, M. J. & ETZEL, R. A. (1999) Overview of investigations into pulmonary hemorrhage among infants in Cleveland, Ohio. Environmental Health Perspectives 107, 495-499

DILL, I., TRAUTMANN, C. & SZEWZYK, R. (1997) Mass development of *Stachybotrys chartarum* on compostable plant pots made from recycled paper. *Mycoses* 40, 110-114

DINKELACKER, A. G., VOGT, S., OBERHETTINGER, P., MAUDER, N., RAU, J., KOSTRZEWA, M., ROSSEN, J. W., AUTENRIETH, I. B., PETER, S. & LIESE, J. (2018) Typing and species identification of clinical *Klebsiella* isolates by Fourier transform infrared spectroscopy and matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology* 56

DROBOTKO, V., MARUSHENKO, P., AIZEMAN, B., KOLESNIK, N., KUDLAI, D., IATEL, P. & MELNICHENKO, V. (1946) Stahkibotriotok-sikoz, novoe zabolivanie loshadei i liudei (Stachybotryotoxicosis, a new disease of horses and human beings). *Vrachebni Delo* 26, 125

DROBOTKO, V. G. (1945) Stachybotryotoxicosis. A new disease of horses and humans. *Am. Rev. Soviet Med.* 2, 238-242

EKRUTH, J., GOTTSCHALK, C., ULRICH, S., GAREIS, M. & SCHWAIGER, K. (2020) Differentiation of *S. chartarum* (Ehrenb.) S. Hughes chemotypes A and S via FT-IR spectroscopy. *Mycopathologia*

ENGVAL, K., NORRBY, C. & NORBÄCK, D. (2001) Sick building syndrome in relation to building dampness in multi-family residential buildings in Stockholm. *Int Arch Occup Environ Health* 74, 270-278

ETZEL, R., MONTANA, E., SORENSON, W. G., KULLMAN, G., MILLER, J. D., JARVIS, B. & DEARBORN, D. G. (1996) Pulmonary Hemosiderosis Associated With Exposure to *Stachybotrys Atra*: T 78. *Epidemiology* 7, S38

ETZEL, R. A., MONTANA, E., SORENSON, W. G., KULLMAN, G. J., ALLAN, T. M., DEARBORN, D. G., OLSON, D. R., JARVIS, B. B. & MILLER, J. D. (1998) Acute pulmonary hemorrhage in infants associated with exposure to *Stachybotrys atra* and other fungi. *Arch Pediatr Adolesc Med* 152, 757-762

FEINBERG, B. & MCLAUGHLIN, C. S. (1989) Biochemical mechanism of action of trichothecene mycotoxins. *Trichothecene mycotoxicosis: pathophysiologic effects* 1, 27-35

FISCHER, G., BRAUN, S., THISSEN, R. & DOTT, W. (2006) FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods* 64, 63-77

FISCHER, G. & DOTT, W. (2002) Quality assurance and good laboratory practice in the mycological laboratory—compilation of basic techniques for the identification of fungi. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 205, 433-442

FLEMING, A. (1929) On the antibacterial action of cultures of a *penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British journal of experimental pathology* 10, 226

FORGACS, J. (1972) Stachybotryotoxicosis. In *Fungal Toxins*. Hrsg. KADIS, A., L., A. J., CIEGLER. New York, United States of America, Academic Press. 95 - 128

FORGACS, J., CARLL, W. T., HERRING, A. S. & HINSHAW, W. R. (1958) Toxicity of *Stachybotrys atra* for animals. *Trans N Y Acad Sci* 20, 787-808

- FORTUSKNY, V. (1959) An outbreak of stachybotryotoxicosis in cattle and its therapy. *Veterinariia* (Moscow) 36, 67
- FRAZER, S., MAGAN, N. & ALDRED, D. (2011) The influence of water activity and temperature on germination, growth and sporulation of *Stachybotrys chartarum* strains. *Mycopathologia* 172, 17-23
- FUNG, F., CLARK, R. & WILLIAMS, S. (1998) *Stachybotrys*, a mycotoxin-producing fungus of increasing toxicologic importance. *J Toxicol Clin Toxicol* 36, 79-86
- GAREIS, M. (1994) Cytotoxicity testing of samples originating from problem buildings. In *Fungi and Bacteria in Indoor Air Environments*. Hrsg. JOHANNING, E., YANG, C. Saratoga Springs, New York, Eastern New York Occupational Health Program. 139-144
- GAREIS, M. (2006) Diagnostischer Zellkulturtest (MTT-Test) für den Nachweis von zytotoxischen Kontaminanten und Rückständen. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 1, 354-363
- GAREIS, M. & GOTTSCHALK, C. (2014) *Stachybotrys* spp. and the guttation phenomenon. *Mycotoxin Res* 30, 151-159
- GAREIS, M., HERBST, E. & GOTTSCHALK, C. (2011) Toxic droplets produced by *Stachybotrys chartarum*. In *International Scientific Conference on Bioaerosols, Fungi, Bacteria, Mycotoxins in Indoor and Outdoor Environments and Human Health*. Saratoga Springs, NY
- GAYDOU, V., LECELLIER, A., TOUBAS, D., MOUNIER, J., CASTREC, L., BARBIER, G., ABLAIN, W., MANFAIT, M. & SOCKALINGUM, G. (2015) Assessing the discrimination potential of linear and non-linear supervised chemometric methods on a filamentous fungi FTIR spectral database. *Analytical Methods* 7, 766-778
- GIESBRECHT, P., NAUMANN, D., LABISCHINSKI, H. & BARNICKEL, G. (1985) A new method for the rapid identification and differentiation of pathogenic microorganisms using Fourier transform infrared spectroscopy. In *Rapid methods and Automation in Microbiology and Immunology*, Springer. 198-206
- GORDON, S. H., WHEELER, B. C., SCHUDY, R. B., WICKLOW, D. T. & GREENE, R. V. (1998) Neural network pattern recognition of photoacoustic FTIR spectra and knowledge-based techniques for detection of mycotoxigenic fungi in food grains. *J Food Prot* 61, 221-230
- GOTTLIEB, D. & VAN ETEN, J. L. (1964) Biochemical changes during the growth of fungi I.: Nitrogen Compounds and Carbohydrate Changes in *Penicillium Atrovenetum*. *Journal of bacteriology* 88, 114-121
- GOTTSCHALK, C., BARTHEL, J., ENGELHARDT, G., BAUER, J. & MEYER, K. (2009) Simultaneous determination of type A, B and D trichothecenes and their occurrence in cereals and cereal products. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 26, 1273-1289
- GOTTSCHALK, C., BAUER, J. & MEYER, K. (2006) Determination of macrocyclic trichothecenes in mouldy indoor materials by LC-MS/MS. *Mycotoxin Res* 22, 189-192
- GOTTSCHALK, C., BAUER, J. & MEYER, K. (2008) Detection of satratoxin g and h in indoor air from a water-damaged building. *Mycopathologia* 166, 103-107
- GÜNZLER, H. & GREMLICH, H.-U. (2012) *IR-Spektroskopie: Eine Einführung*, John Wiley & Sons

- HAAG, H., GREMLICH, H.-U., BERGMANN, R. & SANGIER, J.-J. (1996) Characterization and identification of actinomycetes by FT-IR spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods* 27, 157-163
- HANELT, M., GAREIS, M. & KOLLARCZIK, B. (1994) Cytotoxicity of mycotoxins evaluated by the MTT-cell culture assay. *Mycopathologia* 128, 167-174
- HARRACH, B., BATA, A., BAJMOCY, E. & BENKO, M. (1983) Isolation of satratoxins from the bedding straw of a sheep flock with fatal stachybotryotoxicosis. *Appl Environ Microbiol* 45, 1419-1422
- HARRACH, B., BATA, A., SANDOR, G. & VANYI, A. (1987) Isolation of macrocyclic and non-macrocyclic trichothecenes (*stachybotrys* and *fusarium* toxins) from the Environment of 200 III Sport Horses. *Mycotoxin Res* 3, 65-68
- HASLAM, E. (1986) Secondary metabolism—fact and fiction. *Nat Prod Rep* 3, 217-249
- HAUGLAND, R. A. & HECKMAN, J. L. (1998) Identification of putative sequence specific PCR primers for detection of the toxigenic fungal species *Stachybotrys chartarum*. *Mol Cell Probes* 12, 387-396
- HAUGLAND, R. A., VESPER, S. J. & HARMON, S. M. (2001) Phylogenetic relationships of *Memnoniella* and *Stachybotrys* species and evaluation of morphological features for *Memnoniella* species identification. *Mycologia* 93, 54-65
- HERNANDEZ, F. & CANNON, M. (1982) Inhibition of protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by the 12, 13-epoxytrichothecenes trichodermol, diacetoxyscirpenol and verrucarol. *A. J Antibiot (Tokyo)* 35, 875-881
- HERRES, W. & GRONHOLZ, J. (1984) Understanding FT-IR data processing. Part 1, 352-356
- HESS-KOSA, K. (2018) Indoor air quality: the latest sampling and analytical methods, CRC press
- HIBBETT, D. S. & TAYLOR, J. W. (2013) Fungal systematics: is a new age of enlightenment at hand? *Nature Reviews Microbiology* 11, 129
- HINKLEY, S. F., JIANG, J., MAZZOLA, E. P. & JARVIS, B. B. (1999) Atranones: Novel diterpenoids from the toxigenic mold *Stachybotrys atra*. *Tetrahedron Letters* 40, 2725-2728
- HINKLEY, S. F., MAZZOLA, E. P., FETTINGER, J. C., LAM, Y. F. & JARVIS, B. B. (2000) Atranones A-G, from the toxigenic mold *Stachybotrys chartarum*. *Phytochemistry* 55, 663-673
- HINKLEY, S. F., MOORE, J. A., SQUILLARI, J., TAK, H., OLESZEWSKI, R., MAZZOLA, E. P. & JARVIS, B. B. (2003) New atranones from the fungus *Stachybotrys chartarum*. *Magnetic Resonance in Chemistry* 41, 337-343
- HINTIKKA, E.-L. (1977) The Genus *Stachybotrys*. In *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicosis. An Encyclopedia Handbook*. Hrsg. WYLLIE, T. D., MOREHOUSE, L. G. New York, Basel, Marcel Dekker Inc. 91-98
- HINTIKKA, E.-L. (1978) Human stachybotryotoxicosis, Marcel Dekker Incorporated
- HODGSON, M. J., MOREY, P., LEUNG, W.-Y., MORROW, L., MILLER, D., JARVIS, B. B., ROBBINS, H., HALSEY, J. F. & STOREY, E. (1998) Building-Associated Pulmonary Disease From Exposure to

Stachybotrys chartarum and *Aspergillus versicolor*. Journal of Occupational and Environmental Medicine 40, 241-249

HÖHNE, M. (2008) Untersuchungen zur Mykotoxinbildung durch *Stachybotrys chartarum* Chemotyp S. Fachhochschule Jena. 95

HUGHES, S. J. (1958) Revisiones hyphomycetum aliquot cum appendice de nominibus rejiciendis. Canadian Journal of Botany 36, 727-836

HUNTER, C. A., GRANT, C., FLANNIGAN, B. & BRAVERY, A. F. (1988) Mold in Buildings - the Air Spora of Domestic Dwellings. International Biodeterioration 24, 81-101

JAGELS, A., LINDEMANN, V., ULRICH, S., GOTTSCHALK, C., CRAMER, B., HÜBNER, F., GAREIS, M. & HUMPF, H.-U. (2019) Exploring Secondary Metabolite Profiles of *Stachybotrys* spp. by LC-MS/MS. Toxins (Basel) 11, 133

JARMAI, K. (1929) Viskosusseptikaemien bei älteren Fohlen und erwachsenen Pferden. Dt. Tierärztl. Wschr. 33, 517-519

JARVIS, B. B. (2003) *Stachybotrys chartarum*: a fungus for our time. Phytochemistry 64, 53-60

JARVIS, B. B., EPPLEY, R. M. & MAZZOLA, E. P. (1983) Chemistry of trichothecenes - Chemistry and bioproduction of macrocyclic trichothecenes. In Trichothecenes - Chemical, Biological and Toxicological Aspects. Hrsg. UENO, Y. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V. 20-38

JARVIS, B. B., SALEMME, J. & MORAIS, A. (1995) *Stachybotrys* toxins. 1. Nat Toxins 3, 10-16

JARVIS, B. B., SORENSON, W. G., HINTIKKA, E. L., NIKULIN, M., ZHOU, Y., JIANG, J., WANG, S., HINKLEY, S., ETZEL, R. A. & DEARBORN, D. (1998) Study of toxin production by isolates of *Stachybotrys chartarum* and *Memnoniella echinata* isolated during a study of pulmonary hemosiderosis in infants. Appl Environ Microbiol 64, 3620-3625

JOHANNING, E. (1994) Health problems related to fungal exposure - the example of toxigenic *Stachybotrys chartarum*. In Fungi and Bacteria in Indoor Air Environments. Hrsg. JOHANNING, E., YANG, C. S. Saratoga Springs, New York. 169-182

JOHANNING, E. (1999) Bioaerosols, fungi and mycotoxins: health effects, assessment, prevention and control

JOHANNING, E., BIAGINI, R., HULL, D., MOREY, P., JARVIS, B. & LANDSBERGIS, P. (1996) Health and immunology study following exposure to toxigenic fungi (*Stachybotrys chartarum*) in a water-damaged office environment. Int Arch Occup Environ Health 68, 207-218

JOHANNING, E., GAREIS, M., NIELSEN, K., DIETRICH, R. & MÄRTLBAUER, E. (2002) Airborne mycotoxin sampling and screening analysis. Indoor Air, 1-6

JOHANNING, E., GAREIS, M., YANG, C. S., HINTIKKA, E. L., NIKULIN, M., JARVIS, B. B. & DIETRICH, R. (1998) Toxicity screening of materials from buildings with fungal indoor air quality problems (*Stachybotrys chartarum*). Mycotoxin Res 14, 60-73

JOHANNING, E. & LANDSBERGIS, P. (1999) Clinical findings related to indoor fungal exposure—review of clinical data of a specialty clinic. Bioaerosols, Fungi and Mycotoxins: Health Effects, Assessment, Prevention and Control, 70-78

- JONG, S. C. & DAVIS, E. E. (1976) Contribution to the knowledge of *Stachybotrys* and *Memnoniella* in culture. *Mycotaxon* 3, 409-485
- KAYA-CELIK, H., MALLIKARJUNAN, P. K. & KAAYA, A. (2016) Characterization of invasion of genus *Aspergillus* on peanut seeds using FTIR-PAS. *Food analytical methods* 9, 105-113
- KELLER, N. P., TURNER, G. & BENNETT, J. W. (2005) Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology* 3, 937-947
- KLUWE, H. (2006) Untersuchungen zum Vorkommen und zur Toxizität von *Stachybotrys* spp. in Heu- und Strohproben aus Pferdeställen. In Tierärztliche Fakultät, Veterinärwissenschaftliches Department. München, Ludwig-Maximilians-Universität München
- KORNEEV, N. (1948) Mycotoxicosis in laboratory animals. *Veterinaryia (Moscow)* 25, 36
- KORPINEN, E.-L. & YLIMÄKI, A. (1972) Discovery of toxicogenic *Stachybotrys chartarum* strains in Finland. *Experientia* 28, 108-109
- KOS, G., LOHNINGER, H. & KRŠKA, R. (2002) Fourier transform mid-infrared spectroscopy with attenuated total reflection (FT-IR/ATR) as a tool for the detection of *Fusarium* fungi on maize. *Vibrational Spectroscopy* 29, 115-119
- KOSKINEN, O., HUSMAN, T., HYVARINEN, A., REPONEN, T. & NEVALAINEN, A. (1995) Respiratory Symptoms and Infections among Children in a Day-Care-Center with Mold Problems. *Indoor Air-International Journal of Indoor Air Quality and Climate* 5, 3-9
- KRIEK, N. & MARASAS, W. (1983) Field outbreak of ovine stachybotryotoxicosis in South Africa. *Thrichothecenes-chemical, biological and toxicological aspects*. Amsterdam: Elsevier, 279-284
- KUHN, D. M. & GHANNOUM, M. A. (2003) Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: infectious disease perspective. *Clin Microbiol Rev* 16, 144-172
- LANDIS, J. R. & KOCH, G. G. (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. *biometrics*, 159-174
- LANIER, C., ANDRE, V., SEGUIN, V., HEUTTE, N., EL KADDOUMI, A., BOUCHARTE, V., PICQUET, R. & GARON, D. (2012) Recurrence of *Stachybotrys chartarum* during mycological and toxicological study of bioaerosols collected in a dairy cattle shed. *Ann Agric Environ Med* 19, 61-67
- LAUNER, P., DRECHSLER, H. & SOWA, M. (1987) Stachybotryotoxicosis in a horse herd. *Monatshefte Fur Veterinarmedizin* 42, 593-594
- LECELLIER, A., MOUNIER, J., GAYDOU, V., CASTREC, L., BARBIER, G., ABLAIN, W., MANFAIT, M., TOUBAS, D. & SOCKALINGUM, G. (2014) Differentiation and identification of filamentous fungi by high-throughput FTIR spectroscopic analysis of mycelia. *International Journal of Food Microbiology* 168, 32-41
- LEFEBVRE, H., LE BARS, J., LEGRAND, C., LE BARS, P., DOSSIN, O., TOUTAIN, P. & BRAUN, J. (1994) Three cases of equine stachybotryotoxicosis. *Revue de Medecine Veterinaire (France)*
- LEVENBERG, I., IVANTSOV, L. & PROSTAKOV, M. (1961) On cases of stachybotriotoxicosis in Cattle. *Veterinariya* 38

- LI, C.-S., HSU, C.-W. & TAI, M.-L. (1997) Indoor pollution and sick building syndrome symptoms among workers in day-care centers. *Archives of Environmental Health: An International Journal* 52, 200-207
- LI, S., HARTMAN, G. L., JARVIS, B. B. & TAK, H. (2002) A *Stachybotrys chartarum* isolate from soybean. *Mycopathologia* 154, 41-49
- LI, S., JIANG, Z., XU, W., XIE, Y., ZHAO, L., TANG, X., WANG, F. & XIN, F. (2017a) FIP-sch2, a new fungal immunomodulatory protein from *Stachybotrys chlorohalonata*, suppresses proliferation and migration in lung cancer cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 101, 3227-3235
- LI, Y., LIU, D., CHENG, Z., PROKSCH, P. & LIN, W. (2017b) Cytotoxic trichothecene-type sesquiterpenes from the sponge-derived fungus *Stachybotrys chartarum* with tyrosine kinase inhibition. *RSC Advances* 7, 7259-7267
- LI, Y., WU, C., LIU, D., PROKSCH, P., GUO, P. & LIN, W. (2014) Chartarlactams A–P, phenylspirodrimanes from the sponge-associated fungus *Stachybotrys chartarum* with antihyperlipidemic activities. *J Nat Prod* 77, 138-147
- LIN-VIEN, D., COLTHUP, N. B., FATELEY, W. G. & GRASSELLI, J. G. (1991) *The handbook of infrared and Raman characteristic frequencies of organic molecules*, Elsevier
- LINKER, R. & TSROR, L. (2008) Discrimination of soil-borne fungi using Fourier transform infrared attenuated total reflection spectroscopy. *Applied spectroscopy* 62, 302-305
- LIU, J., JIA, X., ZHAO, J., FENG, J., CHEN, M., CHEN, R., XIE, K., CHEN, D., LI, Y. & ZHANG, D. (2020) Bistachybotrysins LV, Bioactive Phenylspirodrimane Dimers from the Fungus *Stachybotrys chartarum*. *Organic Chemistry Frontiers*
- LOMBARD, L., HOUBRAKEN, J., DECOCK, C., SAMSON, R., MEIJER, M., RÉBLOVÁ, M., GROENEWALD, J. Z. & CROUS, P. W. (2016) Generic hyper-diversity in Stachybotriaceae. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 36, 156
- LORENZ, W., BUHRMANN, C., MOBASHERI, A., LUEDERS, C. & SHAKIBAEI, M. (2013) Bacterial lipopolysaccharides form procollagen-endotoxin complexes that trigger cartilage inflammation and degeneration: implications for the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 15, R111
- MAGAN, N., ALDRED, D., MEDINA, A., KIM, J. K., PESTKA, J. J. & FRAZER, S. (2012) Impact of environmental factors on growth and satratoxin G production by strains of *Stachybotrys chartarum*. *World Mycotoxin Journal* 5, 37-43
- MARTLBAUER, E., GAREIS, M. & TERPLAN, G. (1988) Enzyme immunoassay for the macrocyclic trichothecene roridin A: Production, properties, and use of rabbit antibodies. *Appl Environ Microbiol* 54, 225-230
- MCQUADE, A. B. (1963) Morphogenesis and nutrition in the *Memnionella-Stachybotrys* group of fungi. *J Gen Microbiol* 30, 429-435
- MICLEA, R., TOADER, I. & CORNOIU, I. (2012) Biological control of potential toxigenic fungi in straw used as bedding material for swine. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies* 69

MONTAÑA, E., ETZEL, R. A., ALLAN, T., HORGAN, T. E. & DEARBORN, D. G. (1997) Environmental risk factors associated with pediatric idiopathic pulmonary hemorrhage and hemosiderosis in a Cleveland community. *Pediatrics* 99, e5-e5

MOONEY, J. L. & YAGER, L. N. (1990) Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes & Development* 4, 1473-1482

MUSSALO-RAUHAMAA, H., NIKULIN, M., KOUKILA-KÄHKÖLÄ, P., HINTIKKA, E.-L., MALMBERG, M. & HAAHTELA, T. (2010) Health Effects of Residents Exposed to *Stachybotrys* in Water-damaged Houses in Finland. *Indoor + built environment : the journal of the International Society of the Built Environment*

N.N. (2017) IR Biotyper Benutzerhandbuch, Bruker Daltonik GmbH, Bremen

NAUMANN, D. (1985) The ultra rapid differentiation and identification of pathogenic bacteria using FT-IR techniques. In *Fourier and computerized infrared spectroscopy*, International Society for Optics and Photonics. 268-269

NAUMANN, D., FIJALA, V. & LABISCHINSKI, H. (1988) The differentiation and identification of pathogenic bacteria using FT-IR and multivariate statistical analysis. *Microchimica Acta* 94, 373-377

NAUMANN, D., HELM, D. & LABISCHINSKI, H. (1991) Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature* 351, 81-82

NIELSEN, K. (2003) Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genet Biol* 39, 103-117

NIELSEN, K. F., HANSEN, M. O., LARSEN, T. O. & THRANE, U. (1998) Production of trichothecene mycotoxins on water damaged gypsum boards in Danish buildings. *International Biodeterioration & Biodegradation* 42, 1-7

NIELSEN, K. F., HUTTUNEN, K., HYVARINEN, A., ANDERSEN, B., JARVIS, B. B. & HIRVONEN, M. R. (2002) Metabolite profiles of *Stachybotrys* isolates from water-damaged buildings and their induction of inflammatory mediators and cytotoxicity in macrophages. *Mycopathologia* 154, 201-205

NIESSEN, L. (2018) Anleitung zur Herstellung von Einsporisolationen aus verschiedenen Schimmelpilzen. Freising, Persönliche Mitteilung

NIKULIN, M., PASANEN, A.-L., BERG, S. & HINTIKKA, E.-L. (1994) *Stachybotrys atra* Growth and Toxin Production in Some Building Materials and Fodder under Different Relative Humidities. *Appl Environ Microbiol* 60

NOLARD, N. (1999) Indoor moulds: a public health problem in Belgium: overview of 15 years' experience. *Bioaerosols, Fungi and Mycotoxins: Health Effects, Assessment, Prevention and Control*, 48-53

OOI, P. & GOH, K. (1997) Sick building syndrome: an emerging stress-related disorder? *International Journal of Epidemiology* 26, 1243-1249

PALYUSIK, M. (1970) Experimental stachybotryotoxicosis of young chicks. *Sabouraudia* 8, 4-8

PARADKAR, M. M. & IRUDAYARAJ, J. (2002) Rapid determination of caffeine content in soft drinks using FTIR-ATR spectroscopy. *Food Chemistry* 78, 261-266

- RAND, T. G., FLEMMING, J., DAVID MILLER, J. & WOMILOJU, T. O. (2006) Comparison of inflammatory responses in mouse lungs exposed to atranones A and C from *Stachybotrys chartarum*. J Toxicol Environ Health A 69, 1239-1251
- REDLICH, C. A., SPARER, J. & CULLEN, M. R. (1997) Sick-building syndrome. The Lancet 349, 1013-1016
- ROCHA, O., ANSARI, K. & DOOHAN, F. (2005) Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. Food Addit Contam 22, 369-378
- RÖHR, C. (1997) Spektroskopische Methoden: Schwingungsspektroskopie (IR/RAMAN). http://ruby.chemie.uni-freiburg.de/Vorlesung/Gif_bilder/Methoden_ac/ir_spektrometer_c.png. Letzter Zugriff 11.08.2020
- SABIR, M., SHASHIKIRAN, U. & KOCHAR, S. (1999) Building related illnesses and indoor air pollution. The Journal of the Association of Physicians of India 47, 426-430
- SALMAN, A., POMERANTZ, A., TSOROR, L., LAPIDOT, I., ZWIELLY, A., MOREH, R., MORDECHAI, S. & HULEIHEL, M. (2011) Distinction of *Fusarium oxysporum* fungal isolates (strains) using FTIR-ATR spectroscopy and advanced statistical methods. Analyst 136, 988-995
- SAMSON, R. A. (2010) Food and indoor fungi. Utrecht, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre
- SAMSON, R. A. & FRISVAD, J. C. (2004) *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites, Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht
- SARKISOV, A. (1947) A toxicologic disease in horses. Veterinariia (Moscow) 24, 25
- SARKISOV, A. (1954) Mycotoxicoses (fungal poisonings). Mycotoxicoses (fungal poisonings).
- SCHEEL, C. M., ROSING, W. C. & FARONE, A. L. (2001) Possible sources of sick building syndrome in a Tennessee middle school. Arch Environ Health 56, 413-417
- SCHNEIDER, D. J., MARASAS, W. F., DALE KUY, J. C., KRIEK, N. P. & VAN SCHALKWYK, G. C. (1979) A field outbreak of suspected stachybotryotoxicosis in sheep. J S Afr Vet Assoc 50, 73-81
- SCHOCH, C. L., SEIFERT, K. A., HUHNDORF, S., ROBERT, V., SPOUGE, J. L., LEVESQUE, C. A., CHEN, W. & CONSORTIUM, F. B. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences 109, 6241-6246
- SCHUMAIER, G., DEVOLT, H., LAFFER, N. & CREEK, R. (1963) Stachybotryotoxicosis of chicks. Poultry Science 42, 70-74
- SEMEIKS, J., BOREK, D., OTWINOWSKI, Z. & GRISHIN, N. V. (2014) Comparative genome sequencing reveals chemotype-specific gene clusters in the toxigenic black mold *Stachybotrys*. BMC genomics 15, 590
- SHAPAVAL, V., MØRETRØ, T., SUSO, H. P., ÅSLI, A. W., SCHMITT, J., LILLEHAUG, D., MARTENS, H., BÖCKER, U. & KOHLER, A. (2010) A high-throughput microcultivation protocol for FTIR spectroscopic characterization and identification of fungi. Journal of biophotonics 3, 512-521

SHAPAVAL, V., SCHMITT, J., MØRETRØ, T., SUSO, H., SKAAR, I., ÅSLI, A., LILLEHAUG, D. & KOHLER, A. (2013) Characterization of food spoilage fungi by FTIR spectroscopy. *J Appl Microbiol* 114, 788-796

SHULYUMOV, Y. S., KUZMIN, A. F. & FEDKO, P. A. (1960) Mycotoxicoses of man and agricultural animals. *nach Forgacs* (1972), 167-180

SIVAKESAVA, S. & IRUDAYARAJ, J. (2002) Rapid determination of tetracycline in milk by FT-MIR and FT-NIR spectroscopy. *Journal of Dairy Science* 85, 487-493

SKROMNE, I., SÁNCHEZ, O. & AGUIRRE, J. (1995) Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* brlA regulatory gene. *Microbiology* 141, 21-28

STEINBERG, R. A. (1939) Growth of Fungi in Synthetic Nutrient Solutions

SULYOK, M., KRSKA, R. & SCHUHMACHER, R. (2010) Application of an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds. *Food Chemistry* 119, 408-416

SUSKIND, S. R. & BONNER, D. M. (1960) The effect of mutation on ribonucleic acid, protein and ribonuclease formation in *Neurospora crassa*. *Biochim Biophys Acta* 43, 173-182

TAHA, M., HASSAN, M., ESSA, S. & TARTOR, Y. (2013) Use of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) spectroscopy for rapid and accurate identification of yeasts isolated from human and animals. *International journal of veterinary science and medicine* 1, 15-20

TKACHENKO, A. (1960) Comparative data on Stachybotryotoxicosis of the bison and the hippopotamus. *Mycotoxicoses of Man and Agricultural Animals* (English Transl.), Office of Tech. Ser., US Dept. of Commerce, Washington, 187-195

TROUT, D., BERNSTEIN, J., MARTINEZ, K., BIAGINI, R. & WALLINGFORD, K. (2001) Bioaerosol lung damage in a worker with repeated exposure to fungi in a water-damaged building. *Environmental Health Perspectives* 109, 641-644

TUOMI, T., REIJULA, K., JOHNSON, T., HEMMINKI, K., HINTIKKA, E. L., LINDROOS, O., KALSO, S., KOUKILA-KAHKOLA, P., MUSSALO-RAUHAMAA, H. & HAAHTELA, T. (2000) Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings. *Appl Environ Microbiol* 66, 1899-1904

UENO, Y. (1977) Mode of action of trichothecenes. *Ann Nutr Aliment* 31, 885-900

UENO, Y. (1983) Trichothecenes - Chemical, biological and toxicological aspects. Amsterdam, Elsevier,

UENO, Y. (1984) Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes. *Fundam Appl Toxicol* 4, S124-132

ULRICH, S.-U. (2016) Charakterisierung ausgewählter Isolate von *Stachybotrys* spp. anhand kulturmorphologischer, molekularbiologischer und massenspektrometrischer Verfahren. In Tierärztliche Fakultät, Veterinärwissenschaftliches Department. München, LMU München

ULRICH, S., NIESSEN, L., EKRUTH, J., SCHÄFER, C., KALTNER, F. & GOTTSCHALK, C. (2019) Truncated satratoxin gene clusters in selected isolates of the atranone chemotype of *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb.) S. Hughes. *Mycotoxin Res*, 1-9

- USLEBER, E., DIETRICH, R., SCHNEIDER, E. & MARTLBAUER, E. (2001) *Stachybotrys*-Toxine in einer Münchner Wohnung mit Wasserschaden. *Mycotoxin Res* 17 Suppl 2, 234-237
- VESPER, S., DEARBORN, D. G., YIKE, I., ALLAN, T., SOBOLEWSKI, J., HINKLEY, S. F., JARVIS, B. B. & HAUGLAND, R. A. (2000a) Evaluation of *Stachybotrys chartarum* in the house of an infant with pulmonary hemorrhage: quantitative assessment before, during, and after remediation. *J Urban Health* 77, 68-85
- VESPER, S. J., DEARBORN, D. G., ELIDEMIR, O. & HAUGLAND, R. A. (2000b) Quantification of siderophore and hemolysin from *Stachybotrys chartarum* strains, including a strain isolated from the lung of a child with pulmonary hemorrhage and hemosiderosis. *Appl Environ Microbiol* 66, 2678-2681
- VESPER, S. J., DEARBORN, D. G., YIKE, I., SORENSON, W. G. & HAUGLAND, R. A. (1999) Hemolysis, toxicity, and randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Stachybotrys chartarum* strains. *Appl Environ Microbiol* 65, 3175-3181
- VESPER, S. J., MAGNUSON, M. L., DEARBORN, D. G., YIKE, I. & HAUGLAND, R. A. (2001) Initial characterization of the hemolysin stachylysin from *Stachybotrys chartarum*. *Infect Immun* 69, 912-916
- VESPER, S. J. & VESPER, M. J. (2002) Stachylysin may be a cause of hemorrhaging in humans exposed to *Stachybotrys chartarum*. *Infect Immun* 70, 2065-2069
- WANG, A., XU, Y., GAO, Y., HUANG, Q., LUO, X., AN, H. & DONG, J. (2014) Chemical and bioactive diversities of the genera *Stachybotrys* and *Memnoniella* secondary metabolites. *Phytochemistry reviews* 14, 623-655
- WANG, Y., HYDE, K. D., MCKENZIE, E. H., JIANG, Y.-L., LI, D.-W. & ZHAO, D.-G. (2015) Overview of *Stachybotrys* (*Memnoniella*) and current species status. *Fungal Diversity* 71, 17-83
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S. & TAYLOR, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Hrsg. INNIS, M., GELFAND, D., SHINSKY, J., WHITE, T., Academic Press. 315-322
- WILLIAMS, D. H., STONE, M. J., HAUCK, P. R. & RAHMAN, S. K. (1989) Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *J Nat Prod* 52, 1189-1208
- XAVIER, J. J. M. & SCUSSEL, V. M. (2008) Development of an LC-MS/MS method for the determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in Brazil nut. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 88, 425-433
- XU, X., DE GUZMAN, F. S., GLOER, J. B. & SHEARER, C. A. (1992) Stachybotrins A and B: novel bioactive metabolites from a brackish water isolate of the fungus *Stachybotrys* sp. *The Journal of Organic Chemistry* 57, 6700-6703
- YANG, B., HE, Y., LIN, S., ZHANG, J., LI, H., WANG, J., HU, Z. & ZHANG, Y. (2019) Antimicrobial Dolabellanes and Atranones from a Marine-Derived Strain of the Toxigenic Fungus *Stachybotrys chartarum*. *J Nat Prod* 82, 1923-1929
- ZHANG, M., FENG, J., JIA, X., ZHAO, J., LIU, J., CHEN, R., XIE, K., CHEN, D., LI, Y., ZHANG, D. & DAI, J. (2018) Bistachybotryns D and E, one stereoisomeric pair of cytotoxic phenylspirodrimane dimers from *Stachybotrys chartarum*. *Chinese Chemical Letters*

ZHANG, P., LI, Y., JIA, C., LANG, J., NIAZ, S.-I., LI, J., YUAN, J., YU, J., CHEN, S. & LIU, L. (2017) Antiviral and anti-inflammatory meroterpenoids: stachybonoids A–F from the crinoid-derived fungus *Stachybotrys chartarum* 952. RSC Advances 7, 49910-49916

ZHOU, G., WHONG, W. Z., ONG, T. & CHEN, B. (2000) Development of a fungus-specific PCR assay for detecting low-level fungi in an indoor environment. Mol Cell Probes 14, 339-348

8 Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis, nicht nur für die Überlassung des Themas und die beispiellose Betreuung, sondern auch für die beharrliche Unterstützung auf menschlicher Ebene. Alle Gespräche waren stets zielführend und haben mir sehr weitergeholfen, das Thema zu bearbeiten und darzustellen.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich außerdem Frau PD Dr. habil. Karin Schwaiger aussprechen, die meine Arbeit hervorragend betreut hat und jedes Motivationstief mit einem neuen Denkansatz schnell in neue Energie umgewandelt hat. Ich werde ihr niemals vergessen, wie sie mich im strömenden Regen unter ihren schützenden Schirm geholt und mir ihre helfende Hand gereicht hat.

Außerdem danke ich Herrn Dr. rer. nat. Christoph Gottschalk ausdrücklich dafür, dass er fortwährend an mich und mein Tun geglaubt hat, mich stets zu motivieren wusste und auch in schwierigen Phasen immer vermittelt hat.

Ferner danke ich der Brigitte-und-Wolfram-Gedek-Stiftung für ihre finanzielle Unterstützung. Ich danke allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für ihren tatkräftigen und mentalen Beistand. Besonders danken möchte ich Frau Barbara Fritz, Frau Verena Hohenester und Frau Erika Altgenug für ihre geduldige Einarbeitung und ihre großartigen Hilfestellungen bei der Umsetzung. Die vielen humorvollen und musikuntermalten Stunden im MALDI-Labor mit Herrn Sebastian Schlef werden mir immer in guter Erinnerung bleiben. Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. habil. Ludwig Niessen dafür, dass er sich persönlich Zeit genommen hat, mich in die Kunst der Einsporisolate einzuführen. Herrn PD Dr. habil. Sven Reese gilt mein Dank für die Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner Versuchsergebnisse und der sehr hilfreichen Denkansätze, die mich stets weitergebracht haben. Erwähnenswert sind für mich an dieser Stelle auch alle kleinen und großen Fellnasen, die mir immer die Möglichkeit für eine kleine Ablenkung und einen freien Kopf gegeben haben. Ich danke all meinen Freund*innen für den mir entgegengebrachten Rückhalt in jeder Lebenslage und Frau Eunike Bahlinger und Frau Emma Kaeder für die neu gewonnene Freundschaft von Herzen. Als Letztes, aber mit besonderer Hervorhebung, danke ich meinen Eltern, Frau Brigitte Ekruth und Herrn Walter Ekruth dafür, dass sie mich auf meinem bisherigen Weg stets unterstützt haben.